

Identifizierung und Charakterisierung von umweltfreundlichen Tierarzneimitteln am Beispiel der Sulfonamide

FKZ: 26852-31

Abschlussbericht

Angefertigt von:

Kapitel 1: TihoTox/JLU GIE, LBEG: Prof. Dr. Gerd Hamscher (Projektkoordinator), Dr. Siegrun Mohring, Dr. Heinrich Höper

Kapitel 2: TihoPharm/WDT: Dr. Jessica Stahl, Prof. Dr. Manfred Kietzmann

Kapitel 3: Leuphana: Dr. Annette Haiß, Prof. Dr. Klaus Kümmerer

Kapitel 4: alle Projektpartner

Gießen, Hannover, Lüneburg, Garbsen

2013

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az	26852	Referat	31	Fördersumme	423.478,00 €
Antragstitel	Verringerung des Eintrags an Tierarzneimitteln in die Umwelt mit besser abbaubaren Sulfonamiden				
Stichworte	Umweltchemikalien Boden, Gewässer, Landwirtschaft, Medizin, Tierproduktion				
Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)		
3,5 Jahre	01.10.2009	31.03.2013	1		
Zwischenberichte	Jährlich				
Bewilligungsempfänger	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik Bischofsholder Damm 15 30173 Hannover Ab 01.03.2011: Justus-Liebig-Universität Gießen Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbio- technologie Heinrich-Buff-Ring 58 35392 Gießen			Tel	0641 / 99 34 950
				Fax	0641 / 99 34 959
				Projektleitung Prof. Dr. G. Hamscher	
Kooperationspartner	Prof. Dr. Manfred Kietzmann Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover Institut für Pharmakologie, 30559 Hannover Prof. Dr. Klaus Kümmerer Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene Universitätsklinikum Freiburg 79106 Freiburg Ab 01.10.2010: Leuphana Universität Lüneburg Fakultät für Nachhaltigkeit Institut für Nachhaltige Chemie und Umweltchemie Scharnhorststr. 1 21335 Lüneburg Dr. Klaus Jantzen, Dr. Joachim Lattmann Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG Siemensstr. 14, 30827 Garbsen Dr. Heinrich Höper Landesamt für Bergbau, Energie und Geologie Referat L3.4 Boden- und Grundwassermonitoring Stilleweg 2, 30655 Hannover				
Zielsetzung und Anlaß des Vorhabens					
<p>Arzneimittel werden in der Veterinärmedizin nach wie vor in großen Mengen eingesetzt. Nach Applikation werden die aktiven Wirkstoffe und/oder ihre Metaboliten ausgeschieden und können dann über die Wirtschaftsdünger in den Boden und im Falle der Sulfonamide auch in das Grundwasser gelangen. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass das Umweltverhalten von Tierarzneimitteln auch innerhalb einer klar definierten Substanzgruppe sehr unterschiedlich sein kann.</p> <p>Die Reduzierung des Eintrages von Tierarzneimitteln in die Umwelt durch gezielte Substanzwahl – unter Berücksichtigung von Formulierung und Abbaubarkeit – ist ein grundsätzlich neuer Ansatz zu einer Lösung der Umweltproblematik dieser Wirkstoffe. Hierdurch könnte der Tierarzneimittelleinsatz nicht nur</p>					

quantitativ reduziert sondern durch eine Verringerung des Eintrages an mikrobiologisch aktiven Stoffen auch in qualitativer Hinsicht beeinflusst werden.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Ein Teilaspekt des beantragten Forschungsprojektes besteht darin, die Verlagerbarkeit und somit das Grundwassergefährdungspotenzial verschiedener veterinärmedizinisch bedeutsamer Sulfonamide in Ly-simetern, die auf zwei Standorten mit verschiedenen Bodentypen eingerichtet worden sind, vergleichend zu untersuchen. Die Böden sind umfassend charakterisiert und unterscheiden sich erheblich in der Korngrößenzusammensetzung, dem pH-Wert, dem Humus- sowie dem Kalk- und Skelettgehalt. Die gewonnenen Wasserproben werden dann mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS-MS) quantitativ auf Sulfonamide untersucht.

Die Abbaubarkeit der Wirkstoffe wird mittels anaerober Tests in Anlehnung an die einschlägigen ISO-Vorschriften im Labormaßstab zur Prüfung der anaeroben Abbaubarkeit von Stoffen durchgeführt. Damit werden anaerobe Verhältnisse für die Güllefermentation simuliert. Tests, die möglicherweise hierfür geeignet sein könnten, sind in ISO 13641, ISO 11734 und OECD 311 ausführlich beschrieben und dienen somit als Grundlage für die geplanten Untersuchungen. Die Untersuchung des Abbauverhaltens und möglicher Abbauprodukte erfolgt mittels HPLC-MS-MS und ggf. anderer geeigneter Methoden.

Zur Untersuchung der Photoabbaubarkeit werden die Sulfonamide in wässriger Lösung in verschiedenen Konzentrationen mit UV-Licht (UVA, UVB, UVA/UVB) über unterschiedliche Zeiträume bestrahlt. Bei der Festlegung der einzusetzenden Sulfonamidkonzentrationen werden die praxisüblichen Konzentrationsbereiche (Trinkwasserapplikation, Einsatz in der Aquakultur) vorrangig berücksichtigt. Die Analytik erfolgt mittels HPLC und UV-Detektion, zur Identifizierung von Abbauprodukten wird HPLC-MS-MS eingesetzt werden.

Der Einfluss der Formulierung auf die Pharmakokinetik und letztendlich das Ausscheidungsverhalten der Wirkstoffe soll zunächst beispielhaft für Sulfadiazin untersucht werden. Hierzu werden die Wirkstoffe derzeit als pulverförmige Arzneimittel zur oralen Anwendung eingesetzt. Diese Art der Behandlung birgt das Risiko einer Verschleppung - beispielsweise durch Stäube. Es wird daher angestrebt, Formulierungen herzustellen, bei denen dieses Risiko minimiert ist. Dies können Granulate, mikroverkapselte Formulierungen oder auch wirkstoffbeladene Lipidnanopartikel sein.

Schließlich sollen anhand der Daten aus den unterschiedlichen experimentellen Ansätzen mittels QSAR-Modellierungen Leitstrukturen identifiziert werden, die bei der Synthese neuer umweltfreundlicher Sulfonamide berücksichtigt werden könnten.

Ergebnisse und Diskussion

Lysimeterstudien, Analytik (LBEG, TIHOTOX, seit 01.03.11 JLU GIE)

Eine Analysenmethode für Sulfonamide in Gülle, in Wasserproben und zur Untersuchung von Gärtests wurde entwickelt und den Projektpartnern zur Verfügung gestellt. Darüber hinaus ist es gelungen, die HPLC-Fließmittelsysteme einer bislang eingesetzten Analysenmethode für Sulfonamide von Acetonitril auf Methanol umzustellen. Nach dem Umzug nach Gießen konnte die Empfindlichkeit des Messverfahrens für Wasserproben weiter gesteigert werden.

Fünf Gülle-Beaufschlagungen der Lysimeter wurden im Herbst 2009 und 2010 sowie im Frühjahr 2010, 2011 und 2012 durchgeführt und kontinuierlich beprobt. Hinsichtlich einer Gefährdung des Grundwassers wurden Sulfamethazin und Sulfamethoxazol als schnell verlagerbare Substanzen in Lysimeterversuchen identifiziert. Einige Wirkstoffe gelangten erst nach deutlich längerer Zeit und in sehr niedrigen Konzentrationen in das Ablaufwasser der Lysimeter, während zwei Wirkstoffe (Sulfaguanidin und Sulfathiazol) innerhalb des Untersuchungszeitraums nicht im Lysimeterabfluss nachgewiesen werden konnten. Die Gesamtfrachten der verlagerten Sulfonamide waren gering und betrug deutlich weniger als 1 % der ausgebrachten Wirkstoffmenge. Sulfonamide werden offensichtlich sehr stark im Boden zurückgehalten, jedoch besteht ein langfristiges Auswaschungspotenzial.

Pharmakologie und Photooxidierbarkeit (TIHOPHARM, WDT)

Der Einsatz von Tierarzneimitteln in Aquakulturen bedeutet – zumindest in offenen Systemen – einen unmittelbaren Eintrag von Wirkstoffen in die aquatische Umwelt. Da Sulfonamide durch Sonnenlicht photodegradierbar sind, wurden Abbauraten der einzelnen Wirkstoffe und die Toxizität der entstehenden Transformationsprodukte ermittelt. Die untersuchten Arzneimittel ließen sich hinsichtlich ihrer Abbaubarkeit im UV-Licht in nahezu vollständig abbaubare Substanzen sowie in mittel- bis geringgradig abbaubar einstufen. In-Vitro-Tests an eukaryotischen Zellen ergaben keine adversen Effekte. Durch einen modifizierten mikrobiologischen Hemmstofftest konnte gezeigt werden, dass durch Photodegradation auch die antibakterielle Wirkung der Sulfonamide verloren gehen kann. Toxizitätsstudien an Leuchtbakterien zeigten ein uneinheitliches Bild, eine Wirkungsabschwächung wurde nur für Sulfadiazin beobachtet. Hieraus wurde die vorläufige Schlussfolgerung gezogen, dass bestimmte Sulfonamide unter dem Einfluss von UV-Licht gut transformierbar unter dem Verlust ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit sind. Die Toxizität der Transformationsprodukte lässt sich derzeit nicht abschließend beurteilen und vor einer veterinärmedizinischen Verwendung der in diesem Projekt untersuchten Wirkstoffe müssen weitere standardisierte Toxizitätstests durchgeführt werden.

Die Applikation von Tierarzneimitteln in Pulverform über das Futter führt zu einer hohen Staubentwicklung und Arzneimittel können über den Luftweg auch in andere Stallbereiche verschleppt werden. Darüber hinaus können Landwirte und Tierärzte Stallstäube inhalieren und über die Abluftsysteme der Ställe gelangen Wirkstoffe bis in die Stallumgebung. In praxisnahen Untersuchungen konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Sulfadiazingehalte in Sedimentationsstäuben und auch in Aerosolen bei Pelletfütterung deutlich geringer waren als bei der Mehlfütterung. Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf alle Sulfonamide und auch auf andere Tierarzneimittelgruppen scheint gerechtfertigt zu sein, da die Staubreduktion durch die besondere Formulierung des Arzneimittels erreicht werden konnte. Dies führt letztendlich zu einer geringeren gesundheitlichen Belastung von Mensch und Tier. Durch die Reduktion von Arzneimittelverschleppungen wird auch die Entstehung von Antibiotikaresistenzen im Stall und der unmittelbaren Umgebung minimiert.

Biologische Abbaubarkeit und QSAR (Uni Freiburg, seit 1.10.10 Uni Lüneburg)

Umfangreiche Untersuchungen zur aeroben und anaeroben Abbaubarkeit der Sulfonamide mit Standardtests bzw. adaptierten Standardverfahren wurden durchgeführt, um Strategien für mögliche Aufbereitungsverfahren für sulfonamidhaltige Wirtschaftsdünger zu entwickeln. Hinsichtlich der aeroben Abbaubarkeit sind alle untersuchten Sulfonamide als nicht leicht biologisch abbaubar zu klassifizieren.

Untersuchungen zum anaeroben Abbau mittels Faulschlamm und mit einem Biogassubstrat brachten günstigere Ergebnisse. Während im Faulschlamm kein Sulfonamid zu mehr als 25 % abgebaut werden konnte, konnte im Biogassubstrat für Sulfamethoxazol ein Abbau bis zu 35 % ermittelt werden. Noch höhere Werte wurden für die Primärelimination ermittelt: diese lag z. B. für Sulfamethoxazol bei 84 %. Durch begleitende analytische Methoden konnten nicht nur im Falle des Sulfamethoxazols sondern auch für Sulfamerazin und Sulfadimethoxin Transformationsprodukte nachgewiesen werden. Eine abschließende Strukturaufklärung steht allerdings noch aus. Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch anaerobe Prozesse, die z. B. auch in Biogasanlagen ablaufen, zumindest einzelne Sulfonamide abgebaut werden können. Insofern ließe sich durch die anaerobe Vorbehandlung sulfonamidhaltiger Gülle in Biogasanlagen der Wirkstoffgehalt reduzieren und die als Dünger verwendeten Fermentationsrückstände würden eine zumindest verringerte Arzneimittelfracht in die Böden einbringen.

Für QSAR stehen nur für den Closed Bottle Test (CBT) Bioabbau-Module zur Verfügung, die die expe-

rimentellen Ergebnisse bestätigten, dass die Sulfonamide aerob nicht abbaubar sind. Für die Erweiterung der Datenbasis wurden neben den ausgewählten Sulfonamiden strukturverwandte Substanzen im CBT auf ihre leichte biologische Abbaubarkeit untersucht und die Prüfung der Substanzen im manometrischen Respirationstest (MRT) angeschlossen, bei dem das Inokulum in höherer Konzentration vorliegt. Für den MRT fehlen bislang Abbau-Module.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Wichtige Teilergebnisse des Projektes wurden u.a. auf der 3rd International Conference on Sustainable Pharmacy, 19.-20.11.2012, in Osnabrück als Poster und in folgenden Vorträgen vorgestellt:

- Gerd Hamscher - Replacement of veterinary drugs – possibilities and pitfalls
- Manfred Kietzmann - Potential ways to decrease environmental contaminations of sulfonamides from swine livestock

Die Publikation der Ergebnisse wird teilprojektbezogen in mehreren internationalen Zeitschriften erfolgen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist nach Publikation der Teilprojektdaten in einer veterinärmedizinisch orientierten Zeitschrift vorgesehen.

Der Deutschlandfunk hat in einem Feature zur nachhaltigen Pharmazie berichtet. Projektbezogene Interviews wurden mit Herrn Hamscher, Herrn Kietzmann und Herrn Kümmerer aufgezeichnet. Link: <http://www.dradio.de/dlf/sendungen/forschak/2259359/> (letzter Aufruf am 28.10.2013)

Fazit

Abschließend ist festzuhalten, dass ein umweltfreundliches Sulfonamid für alle veterinärmedizinischen Anwendungen nicht identifiziert werden konnte. Ergebnisse aus den verschiedenen Teilprojekten zeigten aber z. T. sehr deutlich, dass es trotz einer hohen Strukturhomologie innerhalb der Substanzklasse deutliche Unterschiede der einzelnen Sulfonamide im Umwelt- und Abbauverhalten gibt. Darüber hinaus wurde die Arzneimittelformulierung als ein wichtiger Parameter erkannt, der auch über die untersuchte Substanzklasse hinaus wichtige Schlussfolgerungen für andere Stoffgruppen erlaubt.

Zusammenfassung

Durch die Identifizierung und Charakterisierung umweltfreundlicher Tierarzneimittel kann möglicherweise ein wichtiger Beitrag zu einer nachhaltigeren Pharmazie geleistet werden. Daher wurde in einem interdisziplinären Verbundprojekt am Beispiel ausgewählter Sulfonamide versucht, basierend auf umweltrelevanten Eigenschaften, ein Ranking dieser Wirkstoffe zu erstellen. Untersuchungsparameter stellten die Grundwassergängigkeit, der aerobe und anaerobe Abbau, die Photodegradation sowie der Einfluss der Arzneimittelformulierung auf die Umwelteigenschaften dar.

Hinsichtlich einer Gefährdung des Grundwassers wurden Sulfamethazin und Sulfamethoxazol als schnell verlagerbare Substanzen in Lysimeterversuchen identifiziert. Einige Wirkstoffe gelangten erst nach deutlich längerer Zeit und in sehr niedrigen Konzentrationen in das Ablaufwasser der Lysimeter, während zwei Wirkstoffe innerhalb des Untersuchungszeitraums nicht im Lysimeterabfluss nachgewiesen werden konnten. Die Gesamtfrachten der verlagerten Sulfonamide betragen weniger als 1 % der ausgebrachten Wirkstoffmenge. Sulfonamide werden offensichtlich sehr stark im Boden zurückgehalten, jedoch besteht ein langfristiges Auswaschungspotenzial.

Der Einsatz von Tierarzneimitteln in Aquakulturen bedeutet – zumindest in offenen Systemen – einen unmittelbaren Eintrag von Wirkstoffen in die aquatische Umwelt. Da Sulfonamide durch Sonnenlicht photodegradierbar sind, wurden Abbauraten der einzelnen Wirkstoffe und die Toxizität der entstehenden Transformationsprodukte ermittelt. Die untersuchten Arzneimittel ließen sich hinsichtlich ihrer Abbaubarkeit im UV-Licht in nahezu vollständig abbaubare Substanzen sowie in mittel- bis geringgradig abbaubar einstufen. In-Vitro-Tests an eukaryotischen Zellen ergaben keine adversen Effekte. Durch einen modifizierten mikrobiologischen Hemmstofftest konnte gezeigt werden, dass durch Photodegradation auch die antibakterielle Wirkung der Sulfonamide verloren gehen kann. Toxizitätsstudien an Leuchtbakterien zeigten ein uneinheitliches Bild, eine Wirkungsschwächung wurde nur für Sulfadiazin beobachtet. Hieraus wurde die vorläufige Schlussfolgerung gezogen, dass bestimmte Sulfonamide unter dem Einfluss von UV-Licht gut transformierbar unter dem Verlust ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit sind. Die Toxizität der Transformationsprodukte lässt sich derzeit nicht abschließend beurteilen und vor einer veterinärmedizinischen Verwendung der in diesem Projekt untersuchten Wirkstoffe müssen weitere standardisierte Toxizitätstests durchgeführt werden.

Umfangreiche Untersuchungen zur aeroben und anaeroben Abbaubarkeit der Sulfonamide mit Standardtests bzw. adaptierten Standardverfahren wurden durchgeführt, um Strategien für mögliche Aufbereitungsverfahren für sulfonamidhaltige Wirtschaftsdünger zu entwickeln. Hinsichtlich der aeroben Abbaubarkeit sind alle untersuchten Sulfonamide als nicht leicht biologisch abbaubar zu klassifizieren.

Untersuchungen zum anaeroben Abbau mittels Faulschlamm und mit einem Biogassubstrat brachten günstigere Ergebnisse. Während im Faulschlamm kein Sulfonamid zu mehr als 25 % abgebaut werden konnte, konnte im Biogassubstrat für Sulfamethoxazol ein Abbau bis zu 35 % ermittelt werden. Noch höhere Werte wurden für die Primärelimination ermittelt: diese lag z. B. für Sulfamethoxazol bei 84 %. Durch begleitende analytische Methoden konnten nicht nur im Falle des Sulfamethoxazols sondern auch für Sulfamerazin und Sulfadimethoxin Transformationsprodukte nachgewiesen werden. Eine abschließende Strukturaufklärung steht allerdings noch aus. Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch anaerobe Prozesse, die z. B. auch in Biogasanlagen

ablaufen, zumindest einzelne Sulfonamide abgebaut werden können. Insofern ließe sich durch die anerobe Vorbehandlung sulfonamidhaltiger Gülle in Biogasanlagen der Wirkstoffgehalt reduzieren und die als Dünger verwendeten Fermentationsrückstände würden eine zumindest verringerte Arzneimittelfracht in die Böden einbringen.

Die Applikation von Tierarzneimitteln in Pulverform über das Futter führt zu einer hohen Staubentwicklung und Arzneimittel können über den Luftweg auch in andere Stallbereiche verschleppt werden. Darüber hinaus können Landwirte und Tierärzte Stallstäube inhalieren und über die Abluftsysteme der Stallungen gelangen Wirkstoffe bis in die Stallumgebung. In praxishen Untersuchungen konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Sulfadiazingehalte in Sedimentationsstäuben und auch in Aerosolen bei Pelletfütterung deutlich geringer waren als bei der Mehlfütterung. Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf alle Sulfonamide und auch auf andere Tierarzneimittelgruppen scheint gerechtfertigt zu sein, da die Staubreduktion durch die besondere Formulierung des Arzneimittels erreicht werden konnte. Dies führt letztendlich zu einer geringeren Belastung von Mensch und Tier. Durch die Reduktion von Arzneimittelverschleppungen wird auch die Entstehung von Antibiotikaresistenzen im Stall und der unmittelbaren Umgebung minimiert.

Abschließend ist festzuhalten, dass ein umweltfreundliches Sulfonamid für alle veterinärmedizinischen Anwendungen nicht identifiziert werden konnte. Ergebnisse aus den verschiedenen Teilprojekten zeigten aber z. T. sehr deutlich, dass es trotz einer hohen Strukturhomologie innerhalb der Substanzklasse deutliche Unterschiede der einzelnen Sulfonamide im Umwelt- und Abbauverhalten gibt. Darüber hinaus wurde die Arzneimittelformulierung als ein wichtiger Parameter erkannt, der auch über die untersuchte Substanzklasse hinaus wichtige Schlussfolgerungen für andere Stoffgruppen erlaubt.

Inhalt

1	Zielsetzung.....	1
2	Sulfonamide.....	2
3	Untersuchung des Wassergefährdungspotenzials in ungestörten Großlysimetern (Federführung: TIHOTOX, jetzt JLU GIE in enger Zusammenarbeit mit LBEG)	4
3.1	Fragestellung	4
3.2	Methodik	4
3.2.1	Versuchsstandorte	4
3.2.2	Versuchsanstellung.....	4
3.2.3	Analysenverfahren Gülle- und Wasserproben	5
3.3	Ergebnisse.....	7
3.3.1	Sulfonamidgehalte in der Schweinegülle bei Ausbringung	7
3.3.2	Verlagerung gelöster Stoffe am Beispiel des Bromids	8
3.3.3	Verlagerung der Sulfonamide.....	10
3.4	Zusammenfassung.....	11
4	Pharmakologie und Photooxidierbarkeit (TiHo-Pharm)/Entwicklung neuer Formulierungen (WDT)	13
4.1	In-vitro-Photooxidierbarkeit.....	13
4.2	Vitalitätsmessung	14
4.3	Proliferationstest.....	15
4.4	Antibakterielle Wirkung der Sulfonamide nach Photooxidation durch UV-Strahlung.....	17
4.5	In-vivo-Schweineversuch mit Sulfadiazin	17
4.5.1	Mehlfütterung	17
4.5.1.1	Plasma	17
4.5.1.2	Urin	18
4.5.1.3	Sedimentationsstaub.....	19
4.5.1.4	Filterstaub.....	22
4.5.2	Pelletfütterung	24
4.5.2.1	Plasma	24
4.5.2.2	Urin	24
4.5.2.3	Sedimentationsstaub.....	25
4.5.2.4	Filterstaub.....	26
4.6	Zusammenfassung.....	27
5	Biologische Abbaubarkeit und QSAR (Universität Lüneburg ehemals Freiburg)	29
5.1	Sulfonamid-Analytik	29

5.1.1	Probenvorbereitung	29
5.1.1.1	Flüssig-Flüssig-Extraktion	29
5.1.1.2	Festphasenextraktion (SPE).....	29
5.1.2	HPLC UV-Vis.....	30
5.1.3	LC-UV-MS/MS.....	33
5.2	Biologische Abbaubarkeit von Sulfonamiden.....	33
5.2.1	Closed Bottle Test (OECD 301D).....	34
5.2.2	Manometrischer Respirationstest (OECD 301F)	36
5.2.3	Anaerober Abbautest mit Faulschlamm.....	39
5.2.4	Anaerober Abbautest mit Biogassubstrat (in Anlehnung an DIN EN ISO 117341).....	41
5.2.4.1	Etablierung des Tests.....	42
5.2.4.2	Anaerober Abbau der Sulfonamide mit Biogassubstrat.....	46
5.3	Photooxidation von Sulfonamiden.....	54
5.4	Toxizität der Photoabbauprodukte	57
5.5	Ranking	61
6	Zusammenfassende Bewertung.....	63
7	Literatur	67
8	Öffentlichkeitsarbeit.....	69
8.1	Publikationen.....	69
8.2	Vorträge/Poster.....	69
8.3	Rundfunk	70

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1: Sulfonamide.	3
Tab. 3-1: Eigenschaften der Böden (Ap-Horizont) gemäß Höper et al. 2007.....	4
Tab. 3-2: Begüßungstermine und landwirtschaftliche Kulturen.	5
Tab. 3-3: Sulfonamidgehalte in Schweinegülle. Die Alterung erfolgte im Dunkeln (7 Tage, 4 °C).....	7
Tab. 3-4: Vergleich der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen LC-MS-Methodik in Gießen und Hannover.	10
Tab. 3-5: Häufigkeit der Detektion von Sulfonamiden im Lysimeterabfluss (außer SMZ und SMX). ...	11
Tab. 3-6: Bewertung der Sulfonamide aufgrund ihrer Grundwassergängigkeit.	12
Tab. 4-1: Sulfadiazingehalt im Aerosol nach Verabreichung von 25 mg/kg KG Sulfadiazin über 4 Tage (2 x täglich) über das Pelletfutter.....	26
Tab. 4-2: Vergleich des Sulfadiazineintrages in die Stallaerosole während des Vormittags vs. Des Nachmittags.	27
Tab. 4-3: Bewertung der Sulfonamide auf Basis ihrer Photoabbaubarkeit und der antibakteriellen Aktivität der entstandenen Metabolite.	28
Tab. 5-1: Mittlere Wiederfindungsraten (n = 3) der Sulfonamide (10 mg/L) in Biogassubstrat nach Probenvorbereitung mit Flüssig-Flüssig-Extraktion und SPE.	30
Tab. 5-2: Charakteristika der Kalibrationsgeradengleichungen (NWG: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze).....	32
Tab. 5-3: MS-Parameter.	33
Tab. 5-4. Zusammensetzung der Ansätze im CBT (A-D) und MRT (A-E).....	34
Tab. 5-5. Prozentualer Abbau (% ThOD) der Sulfonamide im CBT (Mittelwert der Parallelansätze aus zwei CBTs).....	35
Tab. 5-6: Prozentualer Abbau ausgewählter Sulfonamide im MRT.....	37
Tab. 5-7: Prozentualer Abbau der Sulfonamide im anaeroben Abbau mit Faulschlamm.....	40
Tab. 5-8: Reduktion des anorganischen Kohlenstoffs (IC) im Biogassubstrat.....	43
Tab. 5-9: Anaerobe Abbaubarkeit von Natriummalat nach 28 Tagen.	43
Tab. 5-10: Anaerobe Abbaubarkeit möglicher Referenzsubstanzen in einer Ausgangskonzentration von 50 mg/L DOC.....	45
Tab. 5-11: Anaerobe Abbaubarkeit der Sulfonamide mit Biogassubstrat nach Auswertung des Tests über die Druckentwicklung infolge der Biogasproduktion.....	47
Tab. 5-12: Anaerobe Abbaubarkeit der Sulfonamide mit Biogassubstrat: Gegenüberstellung der Testauswertung über die Biogasproduktion.....	50
Tab. 5-13: Herstellerangaben zum absoluten Photonenfluss der HG-UV TQ 150.	55
Tab. 5-14: Bewertung der Sulfonamide mit einer 3-stufigen Farbgebung aufgrund der Versuchsergebnisse aus den anaeroben Abbauteests und der Photolyse.	62
Tab. 6-1: Zusammenfassung der Bewertungen der Sulfonamide durch die Projektpartner.	63
Tab. 6-2: Abschließende zusammenfassende Bewertung der Sulfonamide.....	64

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1: Sulfonamidstrukturen.....	2
Abb. 3-1: Gülleausbringung auf Maisstoppel (Hohenzethen, Okt. 2010) oder zum Winterraps (Jühnde, Okt. 2010); Photos: LBEG.	5
Abb. 3-2: Zeitlicher Verlauf der Bromid- und Sulfonamidkonzentrationen im Lysimeterabfluss der Fläche Hohenzethen.....	8
Abb. 3-3: Zeitlicher Verlauf der Bromid- und Sulfonamidkonzentrationen im Lysimeterabfluss der Fläche Jühnde.....	8
Abb. 3-4: Zeitlicher Verlauf der kumulierten Bromid- und Sulfamethazinfrachten im Lysimeterabfluss der Fläche Hohenzethen.	9
Abb. 3-5: Zeitlicher Verlauf der kumulierten Bromid- und Sulfamethazinfrachten im Lysimeterabfluss der Fläche Jühnde.....	9
Abb. 4-1: Änderung der Sulfonamidkonzentration in PBS über 6 Stunden bei Bestrahlung mit künstlichem UVA/UVB-Licht.....	13
Abb. 4-2: Änderung der Sulfonamidkonzentration in PBS über 6 Stunden bei Bestrahlung mit künstlichem UVA-Licht.	14
Abb. 4-3: Änderung der Sulfonamidkonzentration in PBS bei 7-tägiger Bestrahlung unter Feldbedingungen (Tageslicht)	14
Abb. 4-4: Vergleichende Darstellung der Auswirkung von Sulfonamiden in der Verdünnung 1:4 auf die Zellvitalität von Keratinozyten und Fibroblasten.	15
Abb. 4-5: Vergleichende Darstellung der Auswirkung von Sulfonamiden in der Verdünnung 1:4 auf die Zellproliferation von Keratinozyten und Fibroblasten.	16
Abb. 4-6: Plasmakonzentration von Sulfadiazin nach Mehlfütterung mit Sulfadiazin.....	17
Abb. 4-7: Plasmakonzentration von Sulfadiazin bei neu eingestellten unbehandelten Schweinen.....	18
Abb. 4-8: Sulfadiazin-Konzentration im Urin nach Mehlfütterung	18
Abb. 4-9: Urinkonzentration von Sulfadiazin bei neu eingestellten unbehandelten Schweinen	19
Abb. 4-10: Lokalisation der Sammelstaubproben im Bereich der Fensterbank, des Futtertrogs und der Rinne.....	20
Abb. 4-11: Lokalisation der Sammelstaubproben im Bereich der Liegefläche und „Gegenüber“ sowie der zwei Pumpen zur Luftfilterung.....	20
Abb. 4-12: Konzentration an Sulfadiazin (SDZ) im Sedimentationsstaub im Bereich der Fensterbank (A), des Troges (B), der Liegefläche (C), der Rinne (D) und gegenüber auf der anderen Seite der Stallgasse (E) während der Mehlfütterung	22
Abb. 4-13: Dosisabhängiger Sulfadiazingehalt in den Stallaerosolen während des Mehlfütterungsversuches	23
Abb. 4-14: Vergleich des Sulfadiazineintrages in die Stallaerosole – vormittags vs. nachmittags.	23
Abb. 4-15: Sulfadiazin-Konzentration im Plasma nach Pelletfütterung.....	24
Abb. 4-16: Sulfadiazin-Konzentration im Urin nach Pelletfütterung	25
Abb. 4-17: Konzentration an Sulfadiazin (SDZ) im Sedimentationsstaub im Bereich der Fensterbank (A), des Troges (B), der Liegefläche (C), der Rinne (D) und gegenüber auf der anderen Seite der Stallgasse (E) während der Pelletfütterung.....	26
Abb. 5-1: Chromatographische Auftrennung (UV-Vis-Detektion) der Sulfonamide in einer Konzentration von 4 mg/L.....	31
Abb. 5-2: CBT mit Sulfadiazin in einer Konz. von 3,9 mg/L (5 mg/L ThOD): prozentualer Abbau im Testansatz mit Sulfadiazin	35

Abb. 5-3: CBT mit Sulfadiazin in einer Konzentration von 3,9 mg/L (5 mg/L ThOD): HPLC-Chromatogramme	36
Abb. 5-4: MRT mit Sulfamerazin in einer Konz. von 21,5 mg/L (30 mg/L ThOD): prozentualer Abbau im Testansatz mit Sulfamerazin	38
Abb. 5-5: CBT mit Sulfamerazin in einer Konzentration von 21,5 mg/L (30 mg/L ThOD): HPLC-Chromatogramme	38
Abb. 5-6: Absolute Druckentwicklung von Sulfadiazin in einer Konzentration von 104 mg/L (50 mg/L OC) im anaeroben Abbauteil	41
Abb. 5-7: Schematischer Aufbau der Biogasanlage	41
Abb. 5-8: Absolute Druckentwicklung und Abbauwerte von Glucose, Natriumacetat und Natriummalat im anaeroben Abbauteil mit Biogassubstrat.	46
Abb. 5-9: Anaerober Abbauteil mit Biogassubstrat: Druckentwicklung	48
Abb. 5-10: Anaerobe Abbauteile mit Biogassubstrat: Druckverläufe in den Testansätzen	49
Abb. 5-11: Massenspektrometrische Auswertung des anaeroben Abbaus von Sulfamerazin mit Biogassubstrat	51
Abb. 5-12: Massenspektrometrische Auswertung des anaeroben Abbaus mit Biogassubstrat von Sulfadimethoxin	52
Abb. 5-13: Strukturvorschlag Transformationsprodukt 1 bzw. 2 von Sulfadimethoxin.....	52
Abb. 5-14: Mengenverteilung von Sulfamethoxazol und seiner Transformationsprodukte anhand der Peakflächen.	53
Abb. 5-15: Massenspektrometrische Auswertung des anaeroben Abbaus mit Biogassubstrat von Sulfamethoxazol	53
Abb. 5-16: Strukturvorschlag für Transformationsprodukt 1 von Sulfamethoxazol.	54
Abb. 5-17: Aktueller Photonenfluss der verwendeten HG-UV TQ 150 (Aktinometer Terbutylazin). .	56
Abb. 5-18: Prozentuale Wiederfindung der Sulfonamide (10 mg/L) nach ihrer UV-Bestrahlung.....	56
Abb. 5-19: UV-Vis-Chromatogramme von Sulfathiazol nach 0 bis 64 min UV-Bestrahlung.	57
Abb. 5-20: Wachstumshemmung von <i>Vibrio fischeri</i> durch die Sulfonamide nach UV-Bestrahlung	58
Abb. 5-21: Wachstumshemmung von <i>Vibrio fischeri</i> durch die Sulfonamide	59
Abb. 5-22: Chronische Leuchtshemmung von <i>Vibrio fischeri</i> durch die Sulfonamide nach UV-Bestrahlung	60
Abb. 5-23: Chronische Leuchtshemmung von <i>Vibrio fischeri</i> durch die Sulfonamide.....	60

Abkürzungsverzeichnis

BG	Bestimmungsgrenze
BGS	Biogassubstrat
CBT	Closed Bottle Test
DOC	Dissolved organic carbon
G	Glucose
GE-1	Gradientenelution 1
GE-2	Gradientenelution 2
HPLC-UV-Vis	High Performance Liquid Chromatography mit UV-Vis Detektion
IC	Inorganic Carbon (anorganischer Kohlenstoffgehalt)
KG	Körpergewicht
LC-ESI-MS/MS	High Performance Liquid Chromatography mit Tandem-massenspektrometrischem Detektor
MRT	Manometrischer Respirationstest
MW	Mittelwert
n. a.	nicht auswertbar
n. m.	nicht messbar
NM	Natriummalat
n. u.	nicht untersucht
NPOC	Non-purgeable organic carbon (nicht ausblasbarer organischer Kohlenstoff)
n. v.	nicht valide
NWG	Nachweisgrenze
OC	Organic Carbon (organischer Kohlenstoffgehalt)
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
QSAR	Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen
R ²	Bestimmtheitsmaß
RSD	relative Standardabweichung
SA	Standardabweichung
SAD	Sulfanilamid
SCY	Sulfachloropyridazin
SDM	Sulfadimethoxin
SDZ	Sulfadiazin
SGU	Sulfaguanidin
SMPD	Sulfamethoxyypyridazin
SMR	Sulfamerazin
SMX	Sulfamethoxazol
SMZ	Sulfamethazin (Synonym: Sulfadimidin)
SPE	solid phase extraction (Festphasenextraktion)
SPY	Sulfapyridazin
STZ	Sulfathiazol
ThOD	Theoretical oxygen demand (Theoretischer Sauerstoffbedarf)

1 Zielsetzung

Arzneimittel werden in der Veterinärmedizin nach wie vor in großen Mengen eingesetzt. Nach Applikation werden die aktiven Wirkstoffe und/oder ihre Metaboliten ausgeschieden und können dann über die Wirtschaftsdünger in den Boden und im Falle der Sulfonamide auch in das Grundwasser gelangen. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass das Umweltverhalten von Tierarzneimitteln auch innerhalb einer klar definierten Substanzgruppe sehr unterschiedlich sein kann.

Die Reduzierung des Eintrages von Tierarzneimitteln in die Umwelt durch gezielte Substanzauswahl – unter Berücksichtigung von Formulierung und Abbaubarkeit – ist ein grundsätzlich neuer Ansatz zu einer Lösung der Umweltproblematik dieser Wirkstoffe. Hierdurch könnte der Tierarzneimittelleinsatz nicht nur quantitativ reduziert sondern durch eine Verringerung des Eintrages an mikrobiologisch aktiven Stoffen auch in qualitativer Hinsicht beeinflusst werden.

Das Hauptziel, ein „umweltfreundliches“ Tierarzneimittel zu identifizieren, sollte durch grundlegende Untersuchungen in anwendungsspezifischen Teilprojekten erreicht werden. In der ersten Projektphase sollte der Einfluss der Arzneimittelformulierung auf die pharmakologischen Eigenschaften und das Ausscheidungsverhalten im Schwein am Beispiel des Sulfadiazins untersucht werden. Parallel hierzu sollte modellhaft das Umweltverhalten verschiedener Sulfonamide – einschließlich des Sulfadiazins – hinsichtlich Verlagerung in das Grundwasser, Abbauverhalten während der Fermentation und ihres Photoabbauverhaltens untersucht werden. Das aus diesen Untersuchungen hervorgehende umweltfreundlichste Sulfonamid sollte danach hinsichtlich seiner Formulierung entsprechend den Erfahrungen aus dem Sulfadiazin-Pilotversuch weiter optimiert werden, um so die therapeutisch notwendigen Dosen senken zu können. Mittels QSAR-Modellierung sollten darüber hinaus Leitstrukturen identifiziert werden, die bei der Synthese neuer umweltfreundlicher Sulfonamide berücksichtigt werden könnten.

Letztendlich sollten die grundlegenden Untersuchungen zu einem neuen, umweltfreundlichen Sulfonamid führen, das aktiv beworben werden kann. Durch den Einsatz dieses Produktes könnte der Einsatz von Tierarzneimitteln einerseits bereits im Stall reduziert werden und andererseits könnten die ausgeschiedenen Rest-Wirkstoffe durch Fermentation inaktiviert bzw. in ihrer Wirkung deutlich abgeschwächt werden. Somit könnte in zwei praxisrelevanten Bereichen der Eintrag von Tierarzneimitteln in die Umwelt verringert werden.

2 Sulfonamide

Sulfonamide sind antibakteriell-wirkende Substanzen und stellen Derivate der p-Aminobenzoessigsäure (Sulfanilsäure) dar. Sie sind die ersten chemisch hergestellten Breitbandantibiotika und werden deshalb häufig auch als „Chemotherapeutika“ bezeichnet. Ihre gemeinsame Grundstruktur gleicht dem Sulfanilamid, das am Amidstickstoff durch verschiedene heterocyclische Reste substituiert wird (Abb. 2-1).

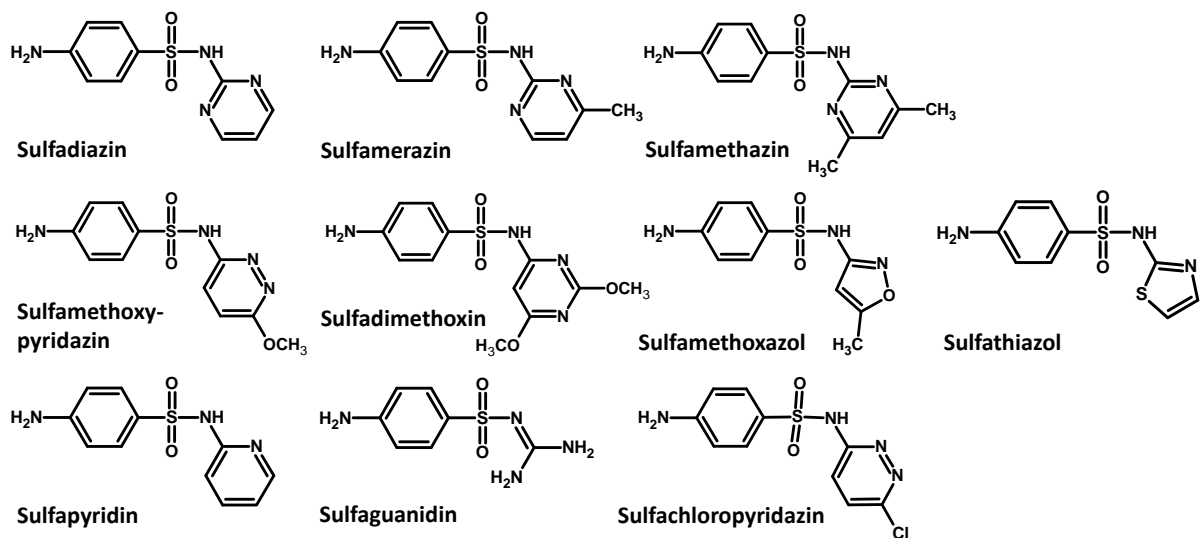


Abb. 2-1: Sulfonamidstrukturen.

Ihr Wirkmechanismus beruht auf der Struktur-Analogie zur p-Aminobenzoessäure. Diese ist ein wichtiger Baustein in der Folsäuresynthese der Bakterien. Durch die Sulfonamide kommt es zu einer kompetitiven Hemmung der Dihydropteroinsäure-Synthetase. Im Weiteren wird dadurch die bakterielle DNA-, RNA- und Eiweißsynthese gestört und die körpereigenen Abwehrkräfte haben die Möglichkeit, die Bakterien abzutöten. Aus diesem Grund spricht man von einer bakteriostatischen Wirkung.

Die wichtigsten Eigenschaften der hier untersuchten Sulfonamide sind in Tab. 2-1 zusammengefasst. Während Sulfamethoxazol vorwiegend in der Humanmedizin eingesetzt wird, werden in der Veterinärmedizin vor allem Sulfadiazin und Sulfamethazin eingesetzt. Häufig werden Sulfonamide auch in Kombination mit Trimethoprim, einem Diaminobenzylpyrimidin-Derivat, eingesetzt, das ebenfalls (an anderer Stelle) in die Folsäuresynthese eingreift. Hierdurch kommt es zu einer synergistischen Wirkung. Trimethoprim wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Tab. 2-1: Sulfonamide.

Sulfonamid		CAS- Nummer	Her- steller (Bestell- nummer)	Molare Masse	pK _s [*]	log K _{ow}	Einsatzgebiete (Zugelassene Arzneimittel in Deutschland)
Sulfaguanidin	SGU	57-67-0	Sigma (32402)	214,3	11,3 ¹	-1,22	-
Sulfadiazin	SDZ	68-35-9	Sigma (35033)	251,3	6,4 ¹	-0,09	Hund, Pferd, Rind, Schaf, Schwein, Ziege, Katze
Sulfapyridin	SPY	144-83-2	Sigma (31738)	249,3	8,4 ¹	0,35	-
Sulfathiazol	STZ	72-14-0	Sigma (46902)	255,3	7,2 ¹	0,05	Schweiz: Pferd, Rind, Schwein
Sulfamerazin	SMR	127-79-7	Sigma (46826)	264,3	7,1 ²	0,14	Pferd
Sulfamethazin (synonym: Sulfadimidin)	SMZ	57-68-1	Sigma (46802)	278,3	7,6 ¹	0,89	-
Sulfamethoxy- pyridazin	SMPD	80-35-3	Sigma (46858)	280,3	6,7 ¹	0,32	Hund, Katze, Pferd, Rind, Schaf, Schwein
Sulfachlor- pyridazin	SCY	80-32-0	Sigma (46778)	284,7	5,9 ³	0,87	-
Sulfamethoxa- zol	SMX	723-46-6	Sigma (46850)	253,3	5,6 ²	0,89	Hühner, Schweine
Sulfadi- methoxin	SDM	122-11-2	Sigma (46794)	310,3	6,7 ²	1,63	Hund, Huhn, Kaninchen, Katze, Taube, Pferd, Rind, Schwein

¹ChemIDPlus Advanced: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>

²A Practical Guide to Contemporary Pharmacy Practice, pKa's of drugs and reference compounds: http://web.squ.edu.om/med-Lib/MED_CD/E_CDs/A%20Practical%20Guide%20to%20Contemporary%20Pharmacy%20Practice/

³CliniPharm: http://www.vetpharm.uzh.ch/wir/00000008/0320__F.htm

*Amidstickstoff

3 Untersuchung des Wassergefährdungspotenzials in ungestörten Großlysimetern (Federführung: TIHOTOX, jetzt JLU GIE in enger Zusammenarbeit mit LBEG)

3.1 Fragestellung

Untersuchungen zur Verlagerung von zehn, mit dotierter Gülle unter Feldbedingungen ausgebrachten, Sulfonamiden mit dem Sickerwasser.

3.2 Methodik

3.2.1 Versuchsstandorte

Es wurden zwei Standorte ausgewählt, die spezifische Risiken der Stoffverlagerung mit dem Sickerwasser abbilden. Der Standort Hohenzethen ist ein Sandboden mit einer hohen Austauschhäufigkeit der Wurzelzone (> 2) in den Wintermonaten (Tab. 3-1). Der Standort Jühnde ist ein toniger Festgesteinsboden mit einem hohen Skelettanteil und einer flachgründigen Ausprägung. Der hohe Skelettanteil erhöhte die Austauschhäufigkeit und den Makroporenfluss, durch die Flachgründigkeit ist ein schneller Eintrag von Stoffen in den Kluftgrundwasserleiter zu erwarten.

Tab. 3-1: Eigenschaften der Böden (Ap-Horizont) gemäß Höper et al. 2007.

	Sand %	Schluff %	Ton %	pH (CaCl ₂)	C _{org} %	N _t %	Kalk %
Hohenzethen	83,5	11,6	4,9	5,7	1,0	0,08	0
Jühnde ¹	4,3	54,4	41,3	7,4	2,6	0,27	0,2

¹Der Skelettanteil (> 2 mm) in Jühnde beträgt 33 % (Tiefe: 0 - 0,2 m)

3.2.2 Versuchsanstellung

Je zwei ungestörte Großlysimeter pro Standort (1 m² Grundfläche, 2 m tief in Hohenzethen und 1 m tief in Jühnde) werden halbjährlich mit 5 m³/ha dotierter Schweinegülle beaufschlagt. Die Gülle wird mit 20 mg/kg der im Projekt zu testenden Sulfonamide sowie mit 100 mg/L Bromid als konservativem, gut wasserlöslichen und sorptionsfreien Tracer versetzt. Vor der Begüllung wird die Gülleprobe eine Woche bei Raumtemperatur gelagert. Eine Rückstellprobe der gelagerten Gülle wird auf Sulfonamide analysiert. Bei Vorhandensein von landwirtschaftlichen Kulturen erfolgte die Ausbringung der Gülle in Streifen, mit einem Litermaß, zwischen die Pflanzen, ohne Einarbeitung (Abb. 3-1). Diese Vorgehensweise entspricht der Praxis der Schleppschlauchausbringung in stehende Bestände. Auf brach liegenden Flächen wurde die Einarbeitung parallel zu den Maßnahmen des Landwirtes vorgenommen.



Abb. 3-1: Gülleausbringung auf Maisstoppel (Hohenzethen, Okt. 2010) oder zum Winterraps (Jühnde, Okt. 2010); Photos: LBEG.

Die Begüllungstermine und die angebauten Kulturen sind in Tab. 3-2 zusammengestellt. In Hohenzethen ergab sich die Fruchtfolge Feldgras – Silomais – Kartoffeln – Winterweizen, in Jühnde wurden Winterweizen und Winterraps angebaut. Bearbeitung – Saat – Düngemaßnahmen und Ernte erfolgten analog zum Vorgehen des Landwirts auf der die Lysimeter umgebenden Boden-Dauerbeobachtungsfläche.

In den ersten vier Wochen nach Begüllung wurde der Lysimeterabfluss wöchentlich, danach zweiwöchentlich quantifiziert und beprobt. Die Wasserproben für die Analytik auf Sulfonamide wurden eingefroren (-18 °C, 100 mL PE-Flaschen), Wasserproben für die Analytik auf Bromid und weitere Anionen und Kationen wurden gekühlt gelagert.

Tab. 3-2: Begüllungstermine und landwirtschaftliche Kulturen.

	Hohenzethen	Jühnde
1. Begüllung	23.10.2009	22.10.2009
Kultur	Feldgras	Winterweizen
2. Begüllung	20.04.2010	19.04.1010
Kultur	Brache, Mais ab Mai 2010	Winterweizen
3. Begüllung	12.10.2010	13.10.2010
Kultur	Stoppeln (Silomais)	Winterraps
4. Begüllung	21.04.2011	20.04.2011
Kultur	Kartoffeln (frisch gelegt)	Winterraps
5. Begüllung	02.11.2011	01.11.2011
	Winterweizen	Winterweizen

3.2.3 Analysenverfahren Gülle- und Wasserproben

Gülleproben

1 g Gülle wird mit Citratpuffer aufgeschlämmt und anschließend zweimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Überstände werden zur Trockene eingedampft und in Acetonitril/Wasser mit 10 mM Ammoniumacetat aufgenommen. Die Bestimmung der Antibiotika erfolgt nach HPLC-Trennung an einer RP-C18-Phase und Gradientenelution (Fließmittel A: 0,5 % Ameisensäure in Wasser, Fließmittel B: Methanol) mittels Elektrospray-Tandemmassenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS, System: LCQ Thermo Scientific). Die Identifizierung der Rückstände erfolgt über die Reten-

tionszeit und das Massenspektrum, die Quantifizierung über die intensivsten Fragmentionen (Hamscher et al. 2005).

Wasserproben

25 mL Wasser werden mit der gleichen Menge Citratpuffer intensiv gerührt und dann mittels Festphasenextraktion an SDB-1-Material¹ vorgereinigt. Die Festphase wird mit Wasser und Methanol gewaschen, die Elution der Wirkstoffe erfolgt mit Methanol und Acetonitril. Das Eluat wird zur Trockene eingedampft und in Methanol aufgenommen. Die Bestimmung der Antibiotika erfolgt nach HPLC-Trennung an einer RP-C18-Phase und Gradientenelution (Fließmittel A: 0,5 % Ameisensäure in Wasser, Fließmittel B: Methanol) mittels Elektrospray-Tandemmassenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS, System: LCQ). Die Identifizierung der Rückstände erfolgt über die Retentionszeit und das Massenspektrum, die Quantifizierung über die intensivsten Fragmentionen (Hamscher et al. 2005).

Im März 2011 erfolgte der Umzug der Arbeitsgruppe (TIHOTOX) nach Gießen. Nach dem Aufbau des spurenanalytischen Labors wurden zunächst die Methoden übertragen. Vor allem für die Analyse der Wasserproben musste gewährleistet sein, dass die vorherigen Nachweisgrenzen erreicht werden. Wie oben beschrieben, werden die Proben mittels SPE bzw. Flüssig-Flüssig-Extraktion aufgearbeitet. Die Aufnahme des zur Trockene eingegangenen Eluats erfolgt im Unterschied zu der in Hannover durchgeführten Methode in einem Gemisch Methanol : Wasser (1:1).

Nach einer Gradiententrennung an einer Hypersil Gold PFP² Säule (100 x 2,1 mm, 1,9 µm) erfolgt die Detektion mittels Elektrospray-Tandemmassenspektrometrie (System: API300 ABSciex). Die Identifizierung der Rückstände erfolgt über die Retentionszeit und die Verhältnisse der drei intensivsten Fragmentionen, die Quantifizierung über die Summe der drei Fragmentionen.

¹ Styrol Divinylbenzol Copolymer, J.T. Baker

² Pentafluorophenyl, Thermo Scientific

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Sulfonamidgehalte in der Schweinegülle bei Ausbringung

Tab. 3-3: Sulfonamidgehalte in Schweinegülle. Die Alterung erfolgte im Dunkeln (7 Tage, 4 °C).

		SGU [mg/kg]	SDZ [mg/kg]	SPY [mg/kg]	STZ [mg/kg]	SMR [mg/kg]	SMZ [mg/kg]	SMPD [mg/kg]	SCY [mg/kg]	SMX [mg/kg]	SDM [mg/kg]
1. Begüllung 23.10.2011	Gülle nicht dotiert	n. u.	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
	Gülle dotiert (20 mg/kg pro Sulfonamid)	n. u.	16,5	13,3	12,8	15,1	17,5	16,5	15,7	17,1	17,0
	Gülle dotiert und 1 Woche gealtert	n. u.	17,5	14,1	13,1	14,8	16,8	14,6	16,4	4,8	15,1
2. Begüllung 20.4.2010	Gülle nicht dotiert	n. u.	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
	Gülle dotiert (20 mg/kg pro Sulfonamid)	n. u.	12,5	11,2	11,7	11,6	12,4	12,4	12,3	12,5	15,8
	Gülle dotiert und 1 Woche gealtert	n. u.	11,9	11,2	11,7	11,3	13	12,9	12,3	6,1	14,7
3. Begüllung 12.10.2010	Gülle dotiert (20 mg/kg pro Sulfonamid)	n. u.	15,2	14,8	13,7	15,3	16,8	16,6	10,4	15,0	14,3
	Gülle dotiert und 1 Woche gealtert	n. u.	14,6	14,5	13,2	14,7	16,5	14,8	10,8	12,3	15,5
4. Begüllung 12.4.2011	Gülle dotiert (20 mg/kg pro Sulfonamid)	6,0	12,3	13,6	13,7	13,7	13,8	13,6	5,8	6,0	14,3
5. Begüllung 24.10.2011	Gülle dotiert (20 mg/kg pro Sulfonamid)	13,5	14,8	18,6	18,1	17,7	15,9	18,0	12,8	15,2	17,9
	Gülle dotiert und 1 Woche gealtert	9,1	15,9	18,1	16,9	18,8	17,0	17,8	5,4	14,0	18,9

SDZ: Sulfadiazin; SPY: Sulfapyridazin; STZ: Sulfathiazol; SMR: Sulfamerazin; SMZ: Sulfamethazin; SMPD: Sulfamethoxy-pyridazin; SCY: Sulfachloropyridazin; SMX: Sulfamethoxazol; SDM: Sulfadimethoxin; n. u.: nicht untersucht

NWG: Nachweisgrenze - SMZ 0,02 mg/kg, andere Sulfonamide 0,05 mg/kg

3.3.2 Verlagerung gelöster Stoffe am Beispiel des Bromids

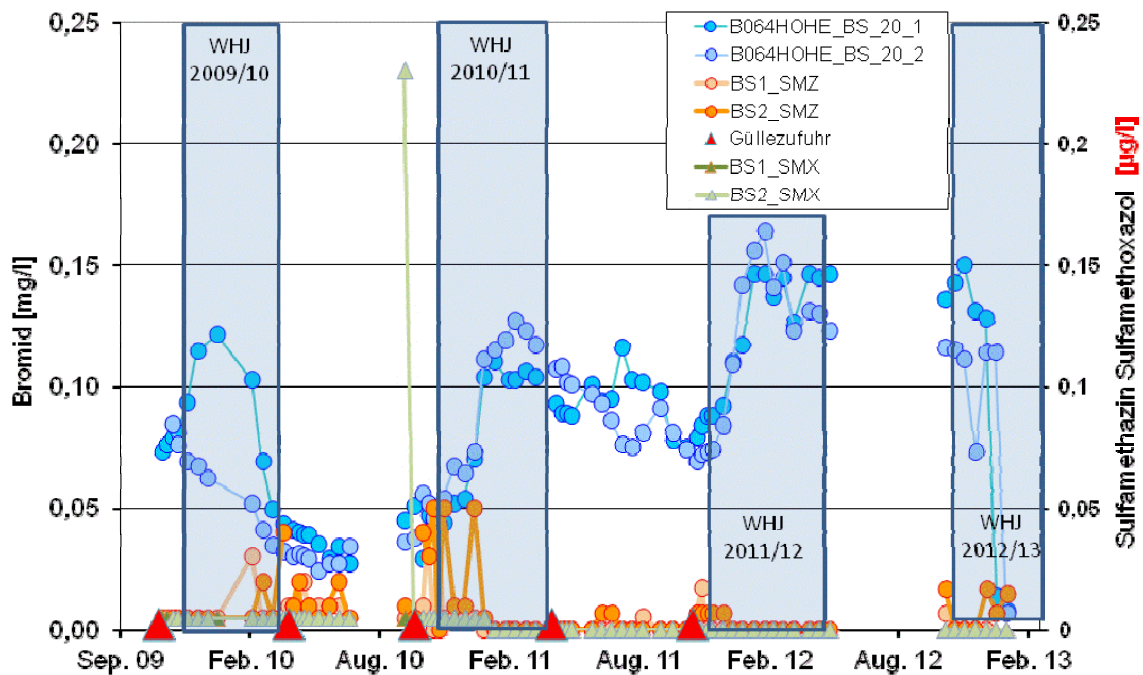


Abb. 3-2: Zeitlicher Verlauf der Bromid- und Sulfonamidkonzentrationen im Lysimeterabfluss der Fläche Hohenzethen.

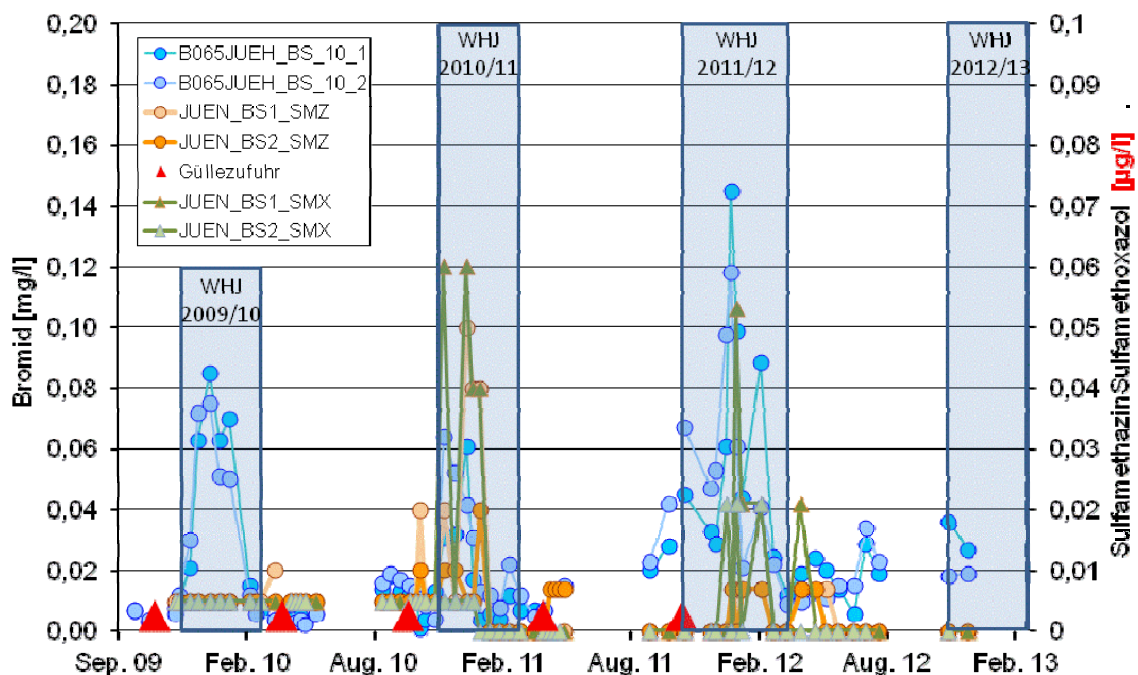


Abb. 3-3: Zeitlicher Verlauf der Bromid- und Sulfonamidkonzentrationen im Lysimeterabfluss der Fläche Jühnde.

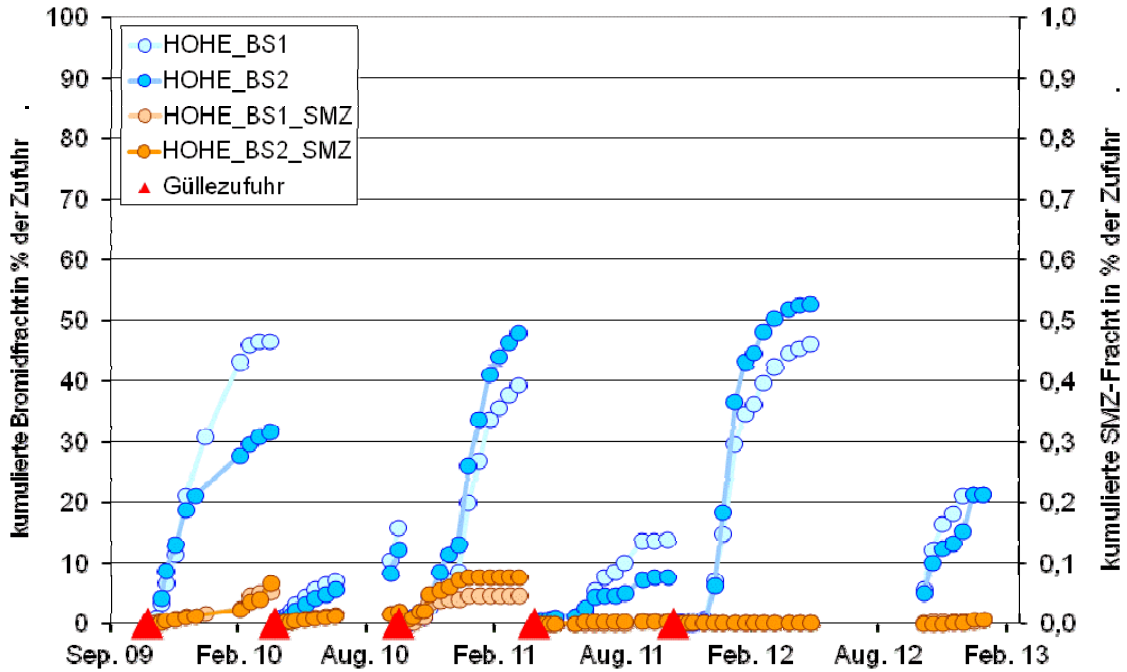


Abb. 3-4: Zeitlicher Verlauf der kumulierten Bromid- und Sulfamethazinfrachten im Lysimeterabfluss der Fläche Hohenzethen.

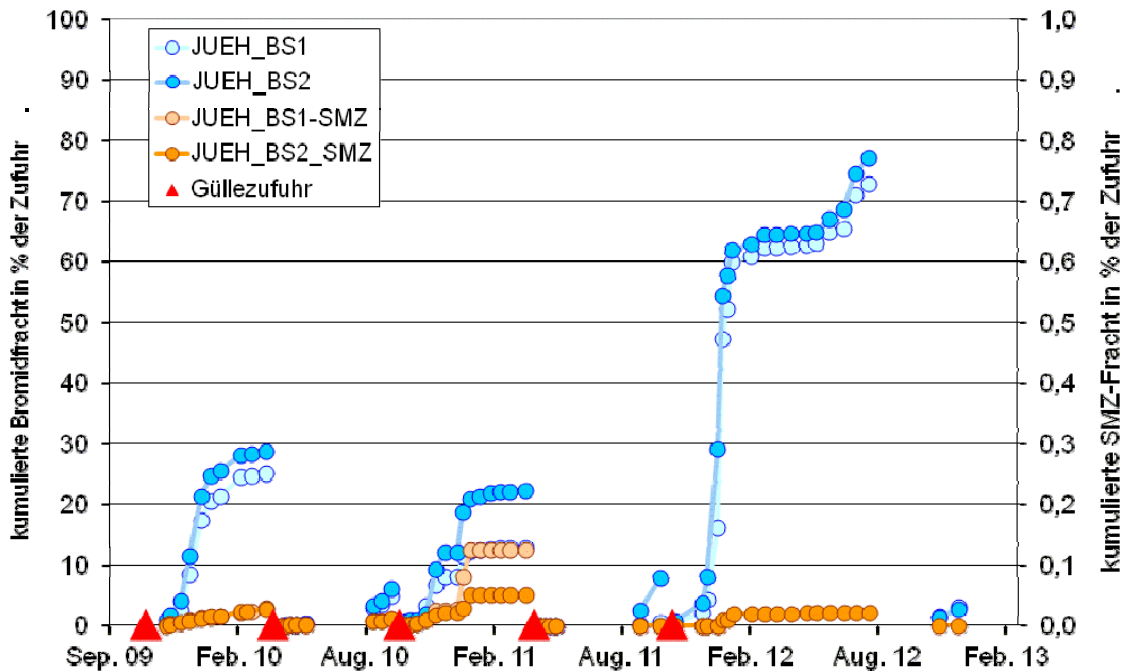


Abb. 3-5: Zeitlicher Verlauf der kumulierten Bromid- und Sulfamethazinfrachten im Lysimeterabfluss der Fläche Jühnde.

Bei der Gülleausbringung im Oktober lässt sich für beide Standorte gut eine Durchbruchkurve des Bromids beobachten (Abb. 3-2 und Abb. 3-3). Die höchsten Konzentrationen werden in der Regel im Januar gemessen und die Werte erreichen im März etwa wieder das Ausgangsniveau.

Die kumulierten Frachten im Winterhalbjahr betragen ca. 30-50 % der ausgebrachten Menge auf dem Standort Hohenzethen und, in den Winterhalbjahren 2009/2010 bzw. 2010/2011, 20 - 30 %, sowie im Winterhalbjahr 2011/2012 ca. 75 % in Jühnde. Die hohe Wiederfindung in Jühnde ist auf besonders hohe Niederschläge im Januar 2012 zurückzuführen. Da Bromid nicht an Bodenpartikel sorbiert, wird es relativ gut ausgetragen. Nicht ausgetragene Anteile finden sich vermutlich in Teilen der Bodenmatrix wieder, die nicht oder nur teilweise vom Sickerwasser durchspült werden (Abb. 3-4 und Abb. 3-5).

Aus den Ergebnissen der Bromid-Tracerversuche lässt sich ableiten, dass die mit der Gülle ausgebrachten löslichen Stoffe im Winterhalbjahr zu Anteilen zwischen 20 und 80 % ausgewaschen werden.

3.3.3 Verlagerung der Sulfonamide

Von den zehn mit der Gülle auf den Lysimetern ausgebrachten Sulfonamiden findet man vor allem Sulfamethazin, Sulfamethoxazol sowie, nach Empfindlichkeitssteigerung in der Analytik, auch Sulfadimethoxin im Sickerwasser. Die Positivbefunde für Sulfamethoxazol lassen darauf schließen, dass durch den Alterungsprozess der Gülle zwar eine starke Elimination des Wirkstoffes stattfindet (bis zu 75 %, siehe Tab. 3-3), diese aber möglicherweise in einer Sorption des Wirkstoffes an Güllepartikel besteht. Unter Feldbedingungen wird Sulfamethoxazol dann wieder desorbiert und gelangt so in das Grundwasser.

Bei Positivbefunden (Befunde oberhalb der Bestimmungsgrenze) wurden zunächst Konzentrationen bis 0,05 µg/L Sulfamethazin und 0,06 µg/L Sulfamethoxazol gemessen, in einem Einzelfall werden 0,23 µg/L Sulfamethoxazol (Standort Hohenzethen) nachgewiesen (Abb. 3-2 und Abb. 3-3).

Für die in Gießen etablierte Methode ergaben sich neue und niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im ng/L-Bereich (Tab. 3-4). Mit diesen war es möglich, neben Sulfamethazin und Sulfamethoxazol auch andere Sulfonamide im Spurenbereich zu detektieren. So konnte Sulfadiazin in einzelnen Proben bis zu einer Konzentration von 0,05 µg/L bestimmt werden. Auch Sulfapyridazin, Sulfamerazin, Sulfamethoxypyridazin und Sulfadimethoxin konnten in Spuren in einigen Proben nachgewiesen werden (Tab. 3-5). Seit Einführung der empfindlicheren Analytik wurde Sulfadimethoxin (SDM) relativ häufig, mit max. 0,038 µg/L gefunden. Sulfaguanidin (SGU) und Sulfathiazol (STZ) wurden nicht gefunden, Sulfapyridin (SPY) wurde dreimal oberhalb der Nachweisgrenze aber unterhalb der Bestimmungsgrenze detektiert.

Tab. 3-4: Vergleich der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen LC-MS-Methodik in Gießen und Hannover.

		SGU	SDZ	SPY	STZ	SMR	SMZ	SMPD	SCY	SMX	SDM
Gießen	NWG µg/L	0,041	0,004	0,008	0,01	0,007	0,005	0,005	0,007	0,016	0,003
	BG µg/L	0,113	0,009	0,022	0,027	0,018	0,014	0,012	0,017	0,042	0,008
Hannover	NWG µg/L	n. b.	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01	0,03	0,03	0,03	0,03
	BG µg/L	n. b.	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05	0,1	0,1	0,1	0,1

n. b. = nicht bestimmbar

Tab. 3-5: Häufigkeit der Detektion von Sulfonamiden im Lysimeterabfluss (außer SMZ und SMX).

Standort	SGU	SDZ	SPY	STZ	SMR	SMPD	SCY	SDM
Hohenzethen	–	2 x < BG	–	–	2 x < BG	–	–	2 x < BG; 2 x 0,009 – 0,038 µg/L
Jühnde	–	6 x 0,01 – 0,05 µg/L; 9 x < BG	3 x < BG	–	1 x 0,03 µg/L; 10 x < BG	1 x < BG	2 x 0,02 – 0,03 µg/L; 7 x < BG	10 x < BG; 8 x 0,008 – 0,033 µg/L

Im ersten Winterhalbjahr werden erst zum Ende der Sickerwasserperiode (März/April) Sulfonamide im Lysimeterabfluss detektiert. Dies deutet auf eine im Vergleich zum Bromid deutlich verzögerte Verlagerung hin. Infolge der geringen Konzentrationen lassen sich allerdings keine „Auswaschkurven“ wie beim Bromid erstellen. Im 2. Winterhalbjahr werden schon früher, im Oktober/November, Sulfonamide im Sickerwasser beobachtet. Diese Fracht stammt vermutlich noch von der vorjährigen Gülleausbringung.

Die nach Begüllung im folgenden Winterhalbjahr kumulierten Sulfamethazin-Frachten betragen, unter Verwendung der Analyseergebnisse bis Ende 2010 (Labor Hannover), am Standort Hohenzethen 0,05 - 0,08 % und am Standort Jühnde 0,03 – 0,12 % der ausgebrachten Menge (Abb. 3-4 und Abb. 3-5).

Mit Umstellung der Analytik werden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen herabgesetzt. Da für die Frachtenberechnung bei Werten unterhalb der BG die halbe BG als Konzentration angesetzt wird, verringern sich dadurch auch die Frachten. Für das Winterhalbjahr 2011/2012 liegen die kumulierten Frachten in Prozent der Zufuhr beim Sulfamethazin zwischen 0,001 % am Standort Hohenzethen und 0,02 % am Standort Jühnde. Die Frachten für Sulfamethoxazol liegen unter 0,001 % am Standort Hohenzethen und bei 0,07 % am Standort Jühnde.

3.4 Zusammenfassung

An zwei Standorten wurden Feldversuche mit Großlysimetern zur Verlagerung von Sulfonamiden mit dem Sickerwasser durchgeführt. Dazu wurde Schweinegülle mit zehn Sulfonamiden dotiert und unter Feldbedingungen mehrmals ausgebracht. Der Lysimeterabfluss wurde in mindestens zweiwöchiger Auflösung beprobt. Von den ausgebrachten Sulfonamiden wurden hauptsächlich Sulfamethazin und Sulfamethoxazol im Lysimeterabfluss nachgewiesen. Eine nach dem Umzug nach Gießen empfindlichere Analytik konnte zeigen, dass weitere Sulfonamide in sehr geringen Konzentrationen ins Grundwasser verlagert werden. Sulfaguanidin und Sulfathiazol konnten im Studienzeitraum nicht detektiert werden.

Die in den Wasserpfad eingetragenen Frachten der Sulfonamide sind insgesamt sehr niedrig. Während bei einem Bromid-Tracer im Winterhalbjahr Frachten von 20 bis 50 % der ausgebrachten Wirkstoffmenge festgestellt wurden, sind dies bei den Sulfonamiden nur ca. 0,1 %. Ein Großteil der Wirkstoffe verbleibt möglicherweise als gebundene Rückstände im Boden, wie Studien von Kreuzig et al. (2003; 2005) zeigen oder wird sequestriert (Rosendahl et al. 2011).

Aufgrund der Grundwassergängigkeit der meisten der untersuchten Sulfonamide ergibt sich die in Tab. 3-6 dargestellte Bewertung.

Tab. 3-6: Bewertung der Sulfonamide aufgrund ihrer Grundwassergängigkeit.

Test auf...	SGU	SDZ	SPY	STZ	SMR	SMZ	SMPD	SCY	SMX	SDM	SAD
Grundwasser- gängigkeit (Anzahl Nachweise)	(0)*	(17)	(3)	(0)*	(13)	(> 50)	(1)	(9)	(12)	(22)	n. u.

SGU: Sulfaguanidin; SDZ: Sulfadiazin; SPY: Sulfapyridazin; STZ: Sulfathiazol; SMR: Sulfamerazin; SMZ: Sulfamethazin; SMPD: Sulfamethoxy-pyridazin; SCY: Sulfachloropyridazin; SMX: Sulfamethoxazol; SDM: Sulfadimethoxin; SAD: Sulfanilamid; n. u.: nicht untersucht; grün: positiv zu bewerten, rot: negativ zu bewerten; gelb: Bewertung nicht eindeutig

***Anmerkung:** Durch eine weitere Absenkung der Nachweisgrenzen könnten noch Positivbefunde erfolgen.

4 Pharmakologie und Photooxidierbarkeit (TiHo-Pharm)/Entwicklung neuer Formulierungen (WDT)

4.1 In-vitro-Photooxidierbarkeit

Sulfonamide, gelöst in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS; pH 7,4; 100 mg/L), zeigen bei Bestrahlung mit UVA-Licht, UVA/UVB-Licht und unter Feldbedingungen bei natürlichem Tageslicht einen unterschiedlich starken Abbau der Sulfonamidkonzentration.

Die Bestrahlung mit UVA/UVB erzeugt dabei drei unterschiedliche Abbaugruppen (Abb. 4-1): 1. geringgradiger Abbau (Sulfamerazin, Sulfadimethoxin, Sulfamethoxazol, Sulfadiazin und Sulfadimidin (= Sulfamethazin)), 2. mittelgradiger Abbau (Sulfachloropyridazin, Sulfamethoxyridazin) und 3. hochgradiger Abbau (Sulfathiazol, Sulfanilamid). Reine UVA-Lichtbestrahlung zeigt eine solche Gruppenbildung nicht (Abb. 4-2). Hier wurden Sulfathiazol und Sulfanilamid nur geringgradig abgebaut und lediglich Sulfachloropyridazin und Sulfamethoxyridazin zeigten eine verstärkte Abbaurate. Die Bestrahlung mit Tageslicht unter Feldbedingungen (Abb. 4-3) erzeugte das gleiche Bild wie die Mischbestrahlung aus künstlichem UVA/UVB-Licht.

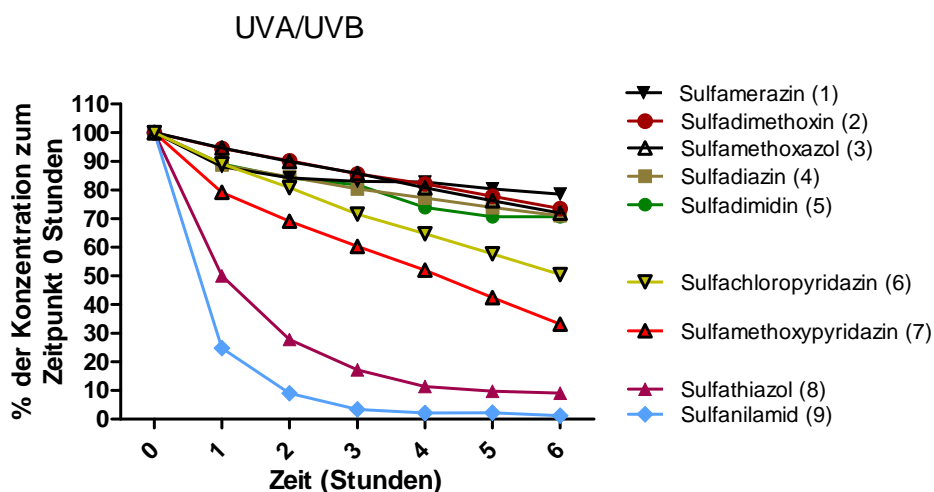


Abb. 4-1: Änderung der Sulfonamidkonzentration in PBS über 6 Stunden bei Bestrahlung mit künstlichem UVA/UVB-Licht.

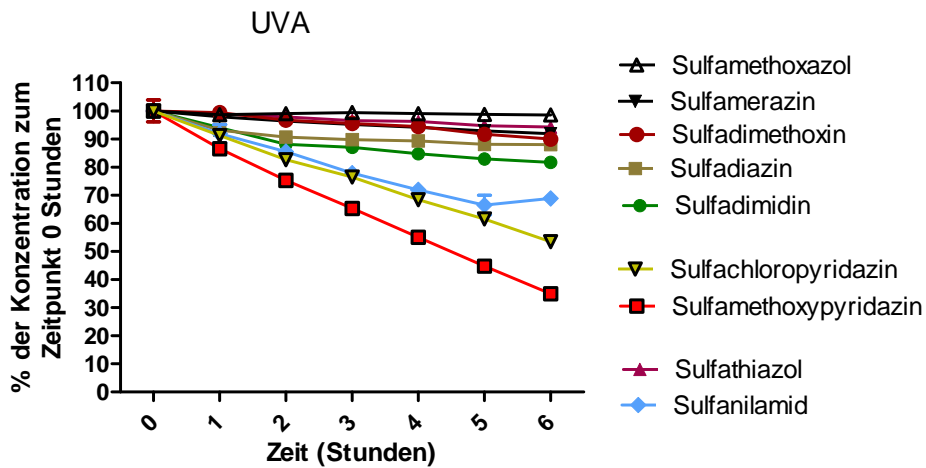


Abb. 4-2: Änderung der Sulfonamidkonzentration in PBS über 6 Stunden bei Bestrahlung mit künstlichem UVA-Licht.

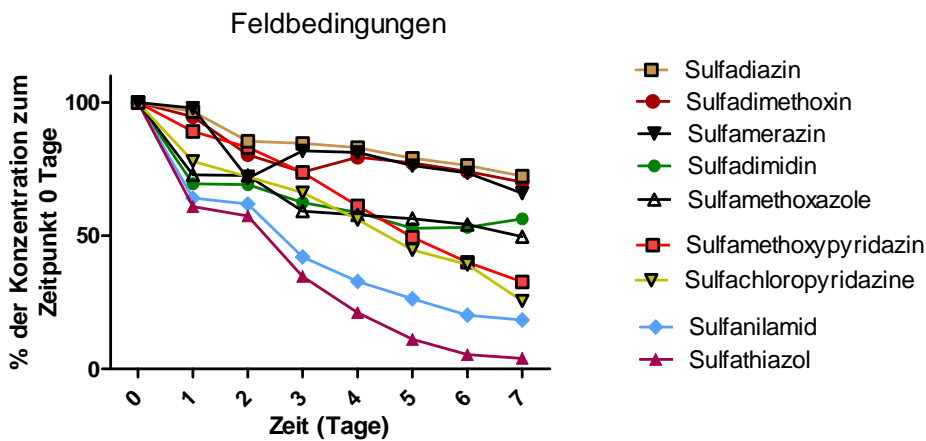


Abb. 4-3: Änderung der Sulfonamidkonzentration in PBS bei 7-tägiger Bestrahlung unter Feldbedingungen (Tageslicht)

4.2 Vitalitätsmessung

Zur Überprüfung des Einflusses der Sulfonamide und ihrer Photooxidationsprodukte auf die Zellvitalität wurden murine Keratinozyten (MSC-P5) sowie murine Fibroblasten (L929) in der Verdünnung 1:4 (entspricht 25 mg/L der unbestrahlten Ausgangssubstanz) behandelt. Die Inkubationszeit betrug 24 und 48 Stunden. In Abb. 4-4 ist die Auswirkung der einzelnen Sulfonamide auf die Zellvitalität im Vergleich zur Medium-Kontrolle (= 100 %) dargestellt. Es zeigte sich, dass die einzelnen Substanzen keinen negativen Effekt auf die Zellvitalität von Keratinozyten und Fibroblasten hatten.

Die Photooxidationsprodukte von Sulfanilamid hingegen führten nach 48-stündiger Inkubation zu einer signifikanten Reduktion der Keratinozytenvitalität.

Verdünnung 1:4 (25 µg/ml der unbestrahlten Ausgangssubstanz)

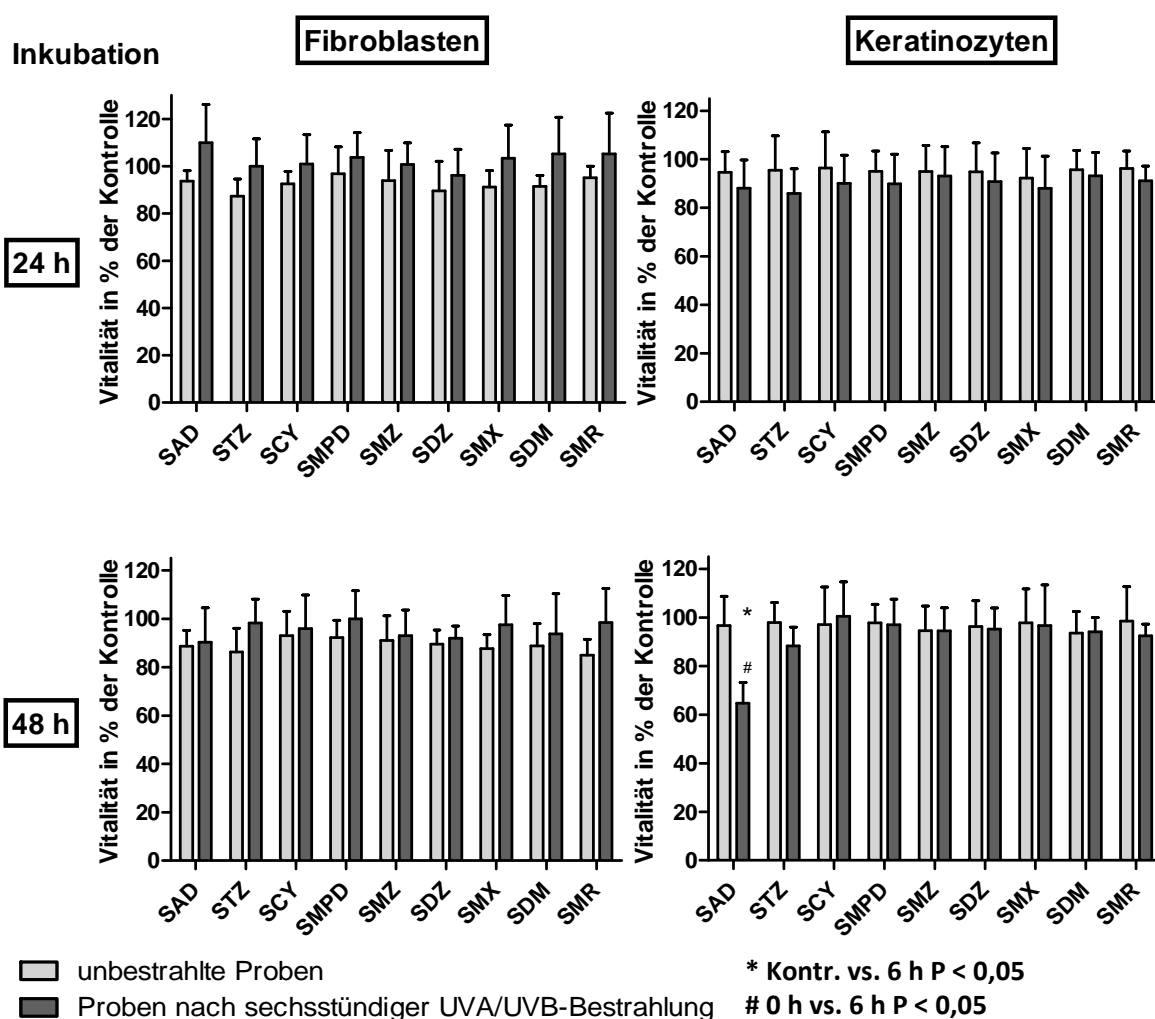


Abb. 4-4: Vergleichende Darstellung der Auswirkung von Sulfonamiden in der Verdünnung 1:4 auf die Zellvitalität von Keratinozyten und Fibroblasten. Die Inkubationszeit betrug 24 bzw. 48 Stunden. Angabe von Mittelwerten +/- Standardabweichung (n = 6). SAD: Sulfanilamid; STZ: Sulfathiazol; SMPD: Sulfamethoxyppyridazin; SCY: Sulfachloropyridazin; SMZ: Sulfamethazin; SMR: Sulfamerazin; SMX: Sulfamethoxazol; SDZ: Sulfadiazin; SDM: Sulfadimethoxin.

4.3 Proliferationstest

Zur Untersuchung des Effektes der Sulfonamide und ihrer Photooxidationsprodukte auf die Zellproliferation wurden die Keratinozyten sowie die Fibroblasten in der Verdünnung 1:4 (entspricht 25 µg/mL der unbestrahlten Ausgangssubstanz) behandelt. Unbestrahltes Sulfanilamid und Sulfathiazol bewirkten nach 24-stündiger Inkubationsdauer bei den Keratinozyten eine geringfügig gesteigerte Zellproliferation (110 %), allerdings in Verbindung mit einer hohen Standardabweichung. Die Photooxidationsprodukte von Sulfathiazol und Sulfachloropyridazin führten zu einer signifikanten Reduktion der Fibroblastenproliferation, während die Photooxidationsprodukte von Sulfamethoxyppyridazin und ebenfalls von Sulfachloropyridazin eine signifikante Reduktion der Keratinozytenproliferation aufwiesen. Nicht-photooxidiertes Sulfamethoxyppyridazin bewirkte nach 24-stündiger Inkubationszeit eine signifikante Reduktion der Keratinozytenproliferation im Vergleich zur Kontrolle.

Die Effekte der Sulfonamide auf das Proliferationsverhalten der Keratinozyten nach 48-stündiger Inkubation waren den Auswirkungen nach 24-stündiger Inkubation ähnlich. Die gesteigerte Keratinozytenproliferation nach Applikation von Sulfanilamid und Sulfathiazol reduzierte sich jedoch auf etwa 95 % (Standardabweichung 17 %). In Abb. 4-5 ist die Auswirkung der einzelnen Sulfonamide auf die Zellproliferation im Vergleich zur Medium-Kontrolle dargestellt.

Verdünnung 1:4 (25 µg/ml der unbestrahlten Ausgangssubstanz)

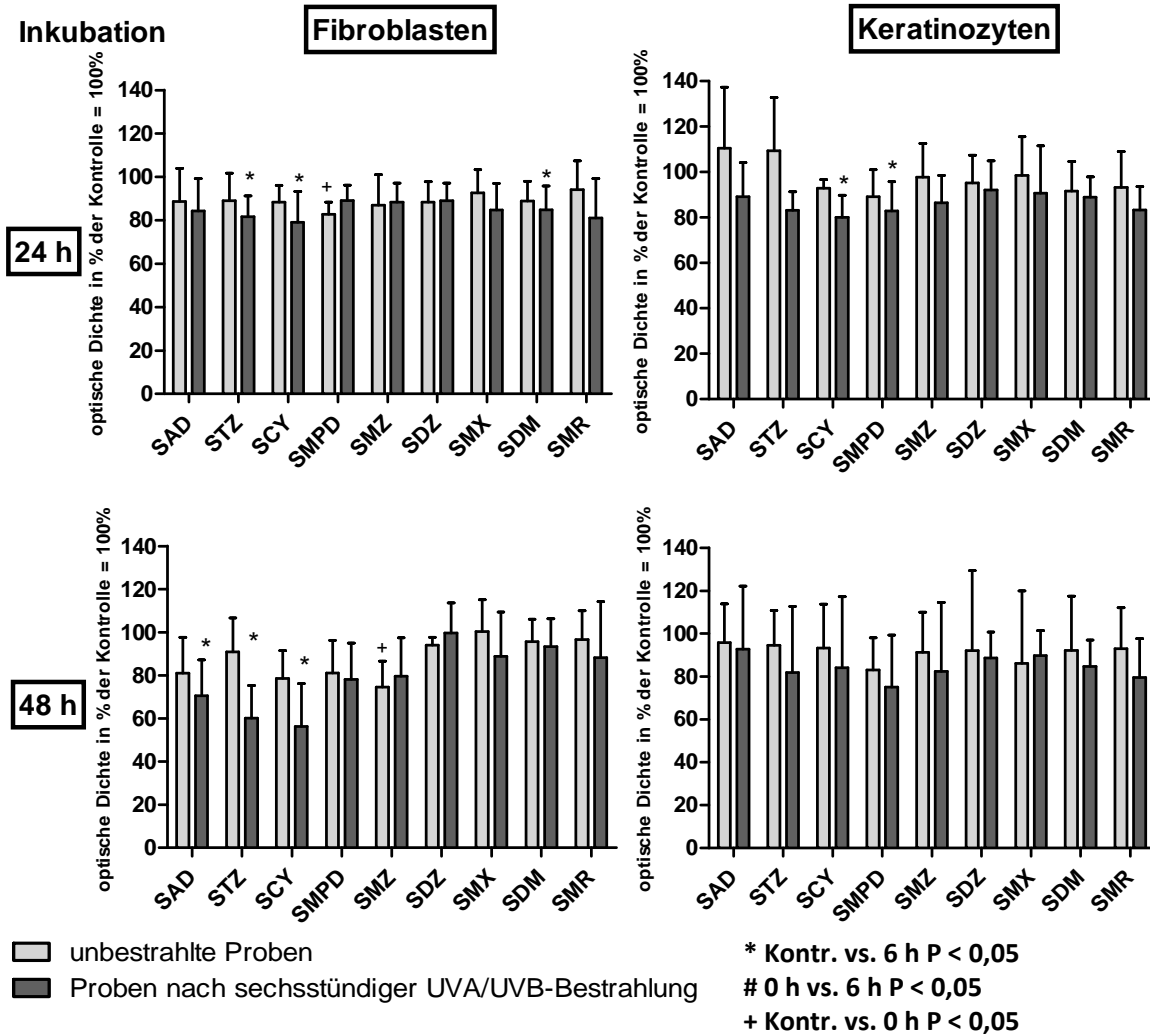


Abb. 4-5: Vergleichende Darstellung der Auswirkung von Sulfonamiden in der Verdünnung 1:4 auf die Zellproliferation von Keratinozyten und Fibroblasten. Die Inkubationszeit betrug 24 bzw. 48 Stunden. Angabe von Mittelwerten +/- Standardabweichung (n = 6). SAD: Sulfanilamid; STZ: Sulfathiazol; SMPD: Sulfamethoxypyridazin; SCY: Sulfachloropyridazin; SMZ: Sulfamethazin; SMR: Sulfamerazin; SMX: Sulfamethoxazol; SDZ: Sulfadiazin; SDM: Sulfadimethoxin.

4.4 Antibakterielle Wirkung der Sulfonamide nach Photooxidation durch UV-Strahlung

Nachdem die Sulfonamide mit UVA/UVB-Licht bestrahlt worden sind, wurde ihre antibakterielle Aktivität mittels modifiziertem Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT MRL Suchtest) mit dem Keim *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 untersucht. Es zeigte sich, dass alle Sulfonamidlösungen nach 6-stündiger UV-Bestrahlung eine verringerte antibakterielle Aktivität aufwiesen. Zudem konnte gezeigt werden, dass entstehende Metaboliten nicht antibakterieller Natur sind.

4.5 In-vivo-Schweineversuch mit Sulfadiazin

4.5.1 Mehlfütterung

4.5.1.1 Plasma

Nach jeweils viertägiger Verabreichung von Sulfadiazin in den Konzentrationen 2,5 und 5 mg/kg KG (unterdosiert) sowie 25 mg/kg KG (bestimmungsgemäße Dosis) über Mehlfutter an sechs Schweine konnten bei jeder der Sulfadiazindosen messbare Plasmaspiegel detektiert werden.

Es wurden bei Fütterung der Dosis 2,5 mg SDZ/kg KG Konzentrationen von im Mittel 0,4–1,0 µg SDZ/mL Plasma erreicht, bei der Dosis 5 mg SDZ/kg KG Konzentrationen von 0,8–2,0 µg SDZ/mL Plasma. Bei Verabreichung der bestimmungsgemäßen Dosis von 25 mg SDZ/kg KG konnten Sulfadiazinkonzentrationen von 5,2–14,2 µg/mL Plasma detektiert werden. Abb. 4-6 zeigt die Ergebnisse.

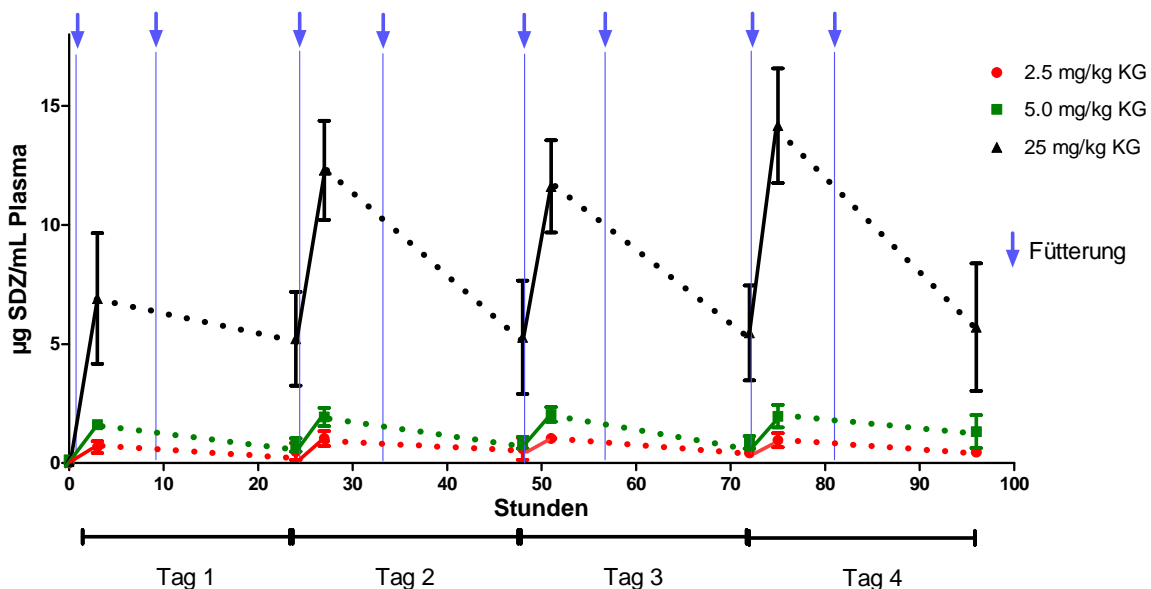


Abb. 4-6: Plasmakonzentration von Sulfadiazin nach Mehlfütterung mit Sulfadiazin in den Dosen 2,5 mg/kg KG, 5 mg/kg KG und 25 mg/kg KG; die Fütterung erfolgte 2 x täglich über 4 Tage (Mittelwert und Standardabweichung von sechs Schweinen).

Nach der Behandlung mit 25 mg/kg KG wurden die Schweine ausgestallt, der Stall trocken gereinigt und anschließend unbehandelte Schweine eingestallt. Im Plasma der unbehandelten Schweine konnten über den Probenentnahmezeitraum von vier Tagen Sulfadiazinkonzentrationen bis etwa 0,1 µg/mL nachgewiesen werden (Abb. 4-7).

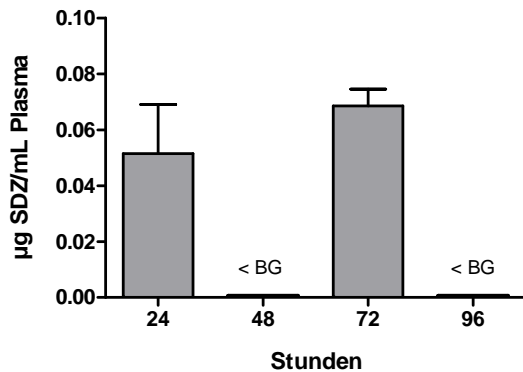


Abb. 4-7: Plasmakonzentration von Sulfadiazin bei neu eingestellten unbehandelten Schweinen, nachdem die Tiere, die mit bestimmungsgemäßer Dosis behandelt worden sind, ausgestallt wurden; BG = 0,1 µg/mL (Mittelwert und Standardabweichung von sechs Schweinen).

4.5.1.2 Urin

Auch im Urin fanden sich dosisabhängig nachweisbare Mengen an Sulfadiazin, die in Abb. 4-8 dargestellt sind. Nach Applikation von 2,5 mg SDZ/kg KG konnten im Urin Sulfadiazinkonzentrationen von 7,7-21,5 µg/mL Urin nachgewiesen werden. Nach Verabreichung der Dosis von 5 mg/kg KG wurden 23,8-45,0 µg SDZ/mL, nach Fütterung der Dosis 25 mg/kg KG wurden 112,3-311,5 µg/mL im Urin detektiert.

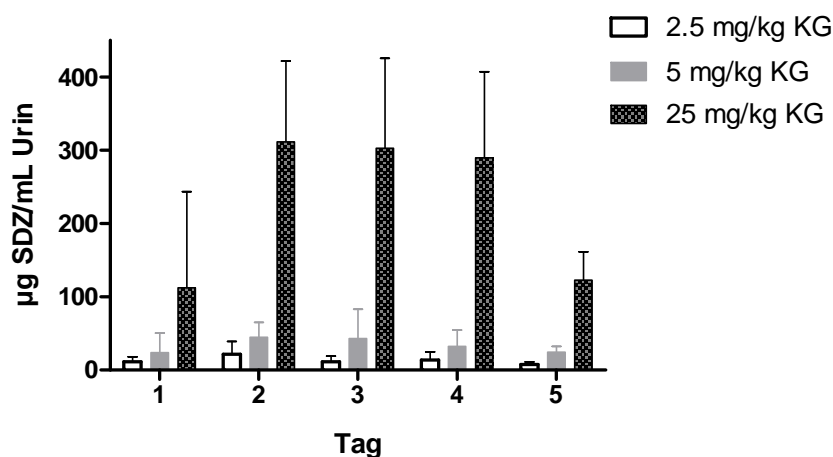


Abb. 4-8: Sulfadiazin-Konzentration im Urin nach Mehlfütterung von 2,5 mg/kg KG, 5 mg/kg KG und 25 mg/kg KG; die Fütterung erfolgte 2 x täglich über 4 Tage (Mittelwert und Standardabweichung von sechs Schweinen).

Nach der Behandlung mit 25 mg/kg KG wurden die behandelten Tiere ausgestallt und unbehandelte Schweine neu eingestallt, deren Sulfadiazingehalt im Urin in Abb. 4-9 dargestellt ist. Im Urin unbehandelter Schweine fand sich über den gesamten Probenentnahmezeitraum von sechs Tagen Sulfadiazin in abnehmenden Konzentrationen von 3,5 µg SDZ/mL Urin bis auf etwa 1 µg SDZ/mL Urin wieder.

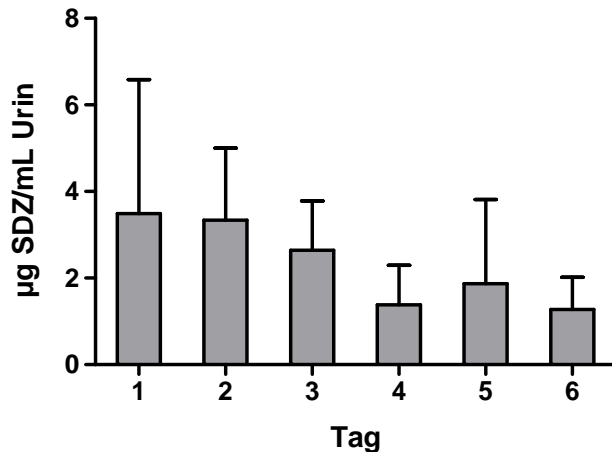


Abb. 4-9: Urinkonzentration von Sulfadiazin bei neu eingestellten unbehandelten Schweinen, nachdem die Tiere, die mit bestimmungsgemäßer Dosis behandelt worden sind, ausgestallt wurden (Mittelwert und Standardabweichung von sechs Schweinen).

4.5.1.3 Sedimentationsstaub

Die Untersuchung von Sedimentationsstaubproben aus unterschiedlichen Bereichen des Stalles (Abb. 4-10 und Abb. 4-11) zeigte, dass sich während der Mehlfütterung innerhalb der Behandlungstage nachweisbare Mengen an Sulfadiazin im Staub befanden (Abb. 4-12). Parallel zu jeder Dosiserhöhung kam es zu einem Anstieg der Sulfadiazinkonzentration an allen fünf Lokalisationen. Dabei gab es starke Konzentrationsunterschiede hinsichtlich der Lokalisation der Sammelstaubproben. Die höchsten Gehalte konnten im Bereich des Troges gemessen werden, gefolgt von dem Bereich der Fensterbank, der anderen Seite der Stallgasse, der Rinne sowie der Liegefläche.

An allen fünf Lokalisationen ließ sich auch nach Abschluss der Behandlung weiterhin Sulfadiazin im Bereich von 0,6-1,9 µg/mg über sechs Tage in den Stallstäuben nachweisen. Im Futter befanden sich bei einer Dosis von 2,5 mg/kg KG ca. 94 mg SDZ/kg Futter, bei einer Dosis von 5 mg/kg KG 151 mg/kg Futter sowie bei einer Dosis von 25 mg/kg KG ca. 820 mg SDZ/kg Futter.

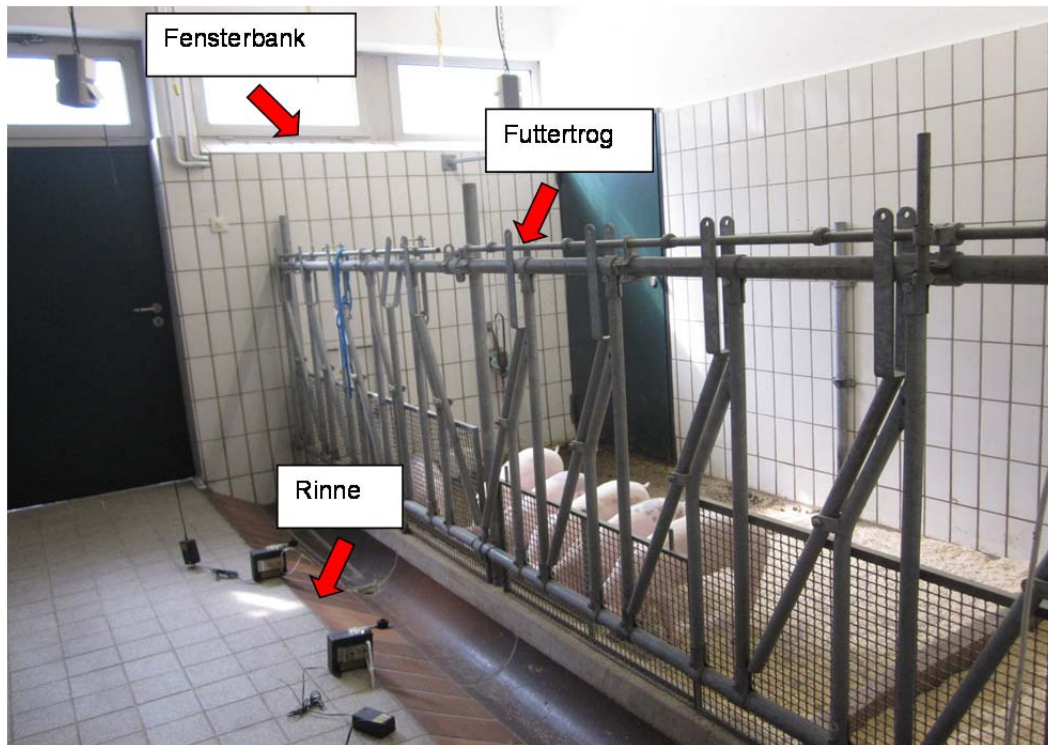


Abb. 4-10: Lokalisation der Sammelstaubproben im Bereich der Fensterbank, des Futtertrogs und der Rinne.

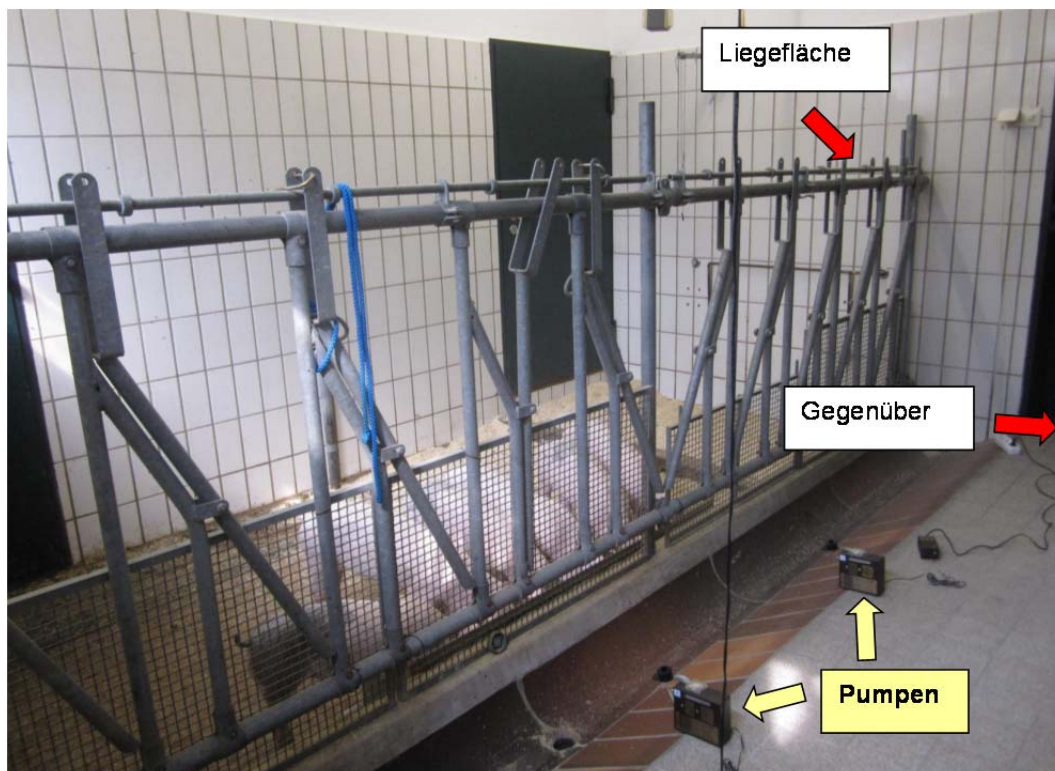
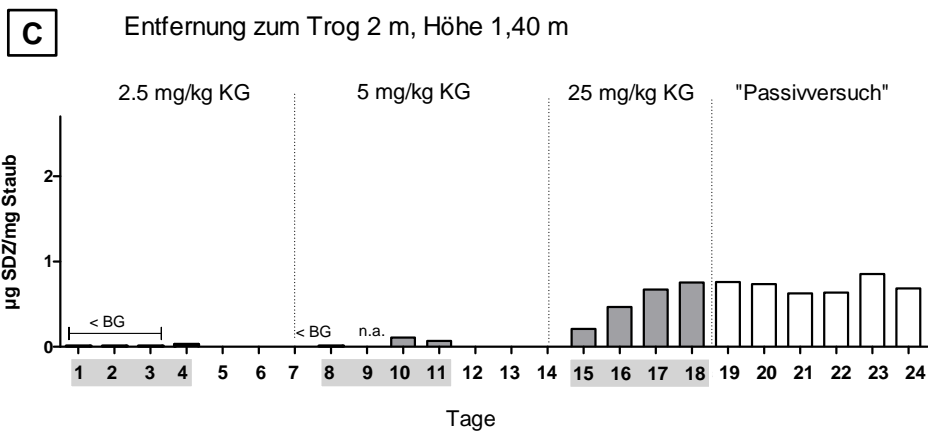
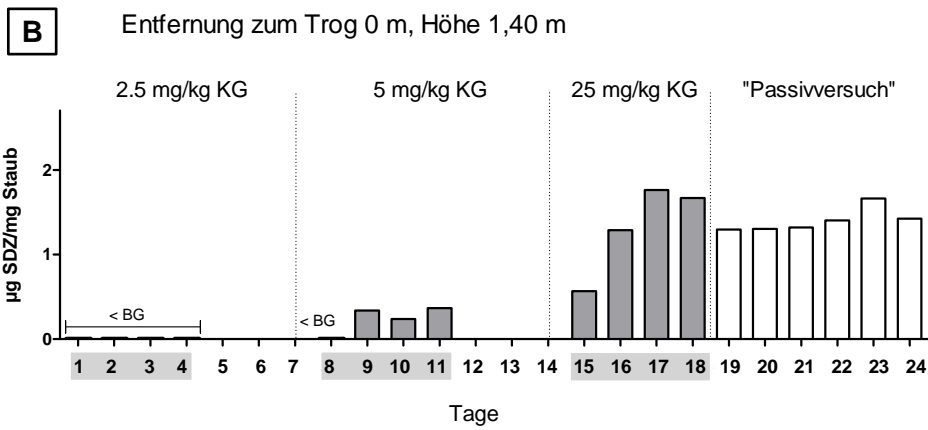
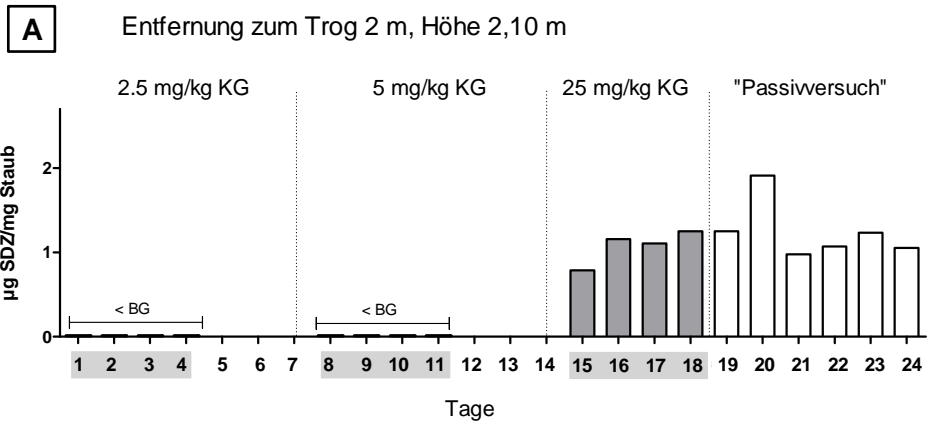


Abb. 4-11: Lokalisation der Sammelstaubproben im Bereich der Liegefläche und „Gegenüber“ sowie der zwei Pumpen zur Luftfilterung.



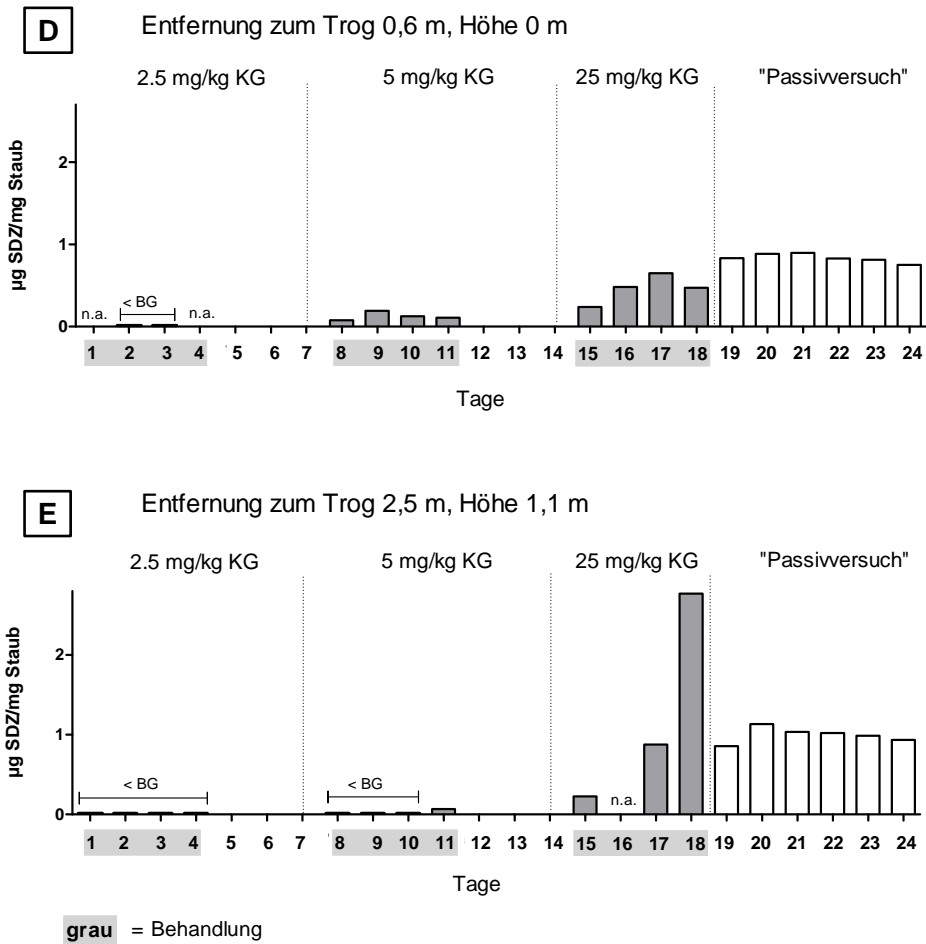


Abb. 4-12: Konzentration an Sulfadiazin (SDZ) im Sedimentationsstaub im Bereich der Fensterbank (A), des Troges (B), der Liegefläche (C), der Rinne (D) und gegenüber auf der anderen Seite der Stallgasse (E) während der Mehlfütterung; die weißen Balken signalisieren das Fehlen der Sulfadiazin-Fütterung; BG = 0,1 µg/mL; n. a. = nicht auswertbar.

4.5.1.4 Filterstaub

Sulfadiazin wurde ebenfalls in Stallaerosolen nachgewiesen. Auch nach Abschluss der Behandlung an Tag 18 wurde in den darauffolgenden Tagen bis Tag 24 Sulfadiazin im Bereich von 0,3-1,6 µg/m³ in den Aerosolen detektiert (Abb. 4-13).

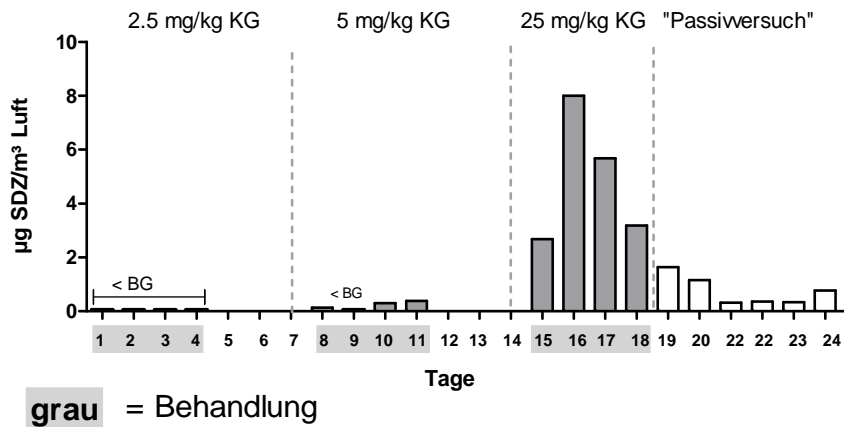


Abb. 4-13: Dosisabhängiger Sulfadiazingehalt in den Stallaerosolen während des Mehlfütterungsversuches; die weißen Balken signalisieren das Fehlen der Sulfadiazin-Fütterung; BG = 0,1 µg/mL.

Zur Überprüfung des Sulfadiazingehaltes in den Stallaerosolen in Abhängigkeit von der Tageszeit, wurden vergleichende Messungen vormittags und nachmittags durchgeführt. Auch hier ließ sich der Sulfadiazingehalt dosisabhängig in den Aerosolen nachweisen (Abb. 4-14). Beide Messintervalle enthielten jeweils einen Fütterungszeitpunkt, jedoch war keine kontinuierliche Sulfadiazinverteilung ermittelbar.

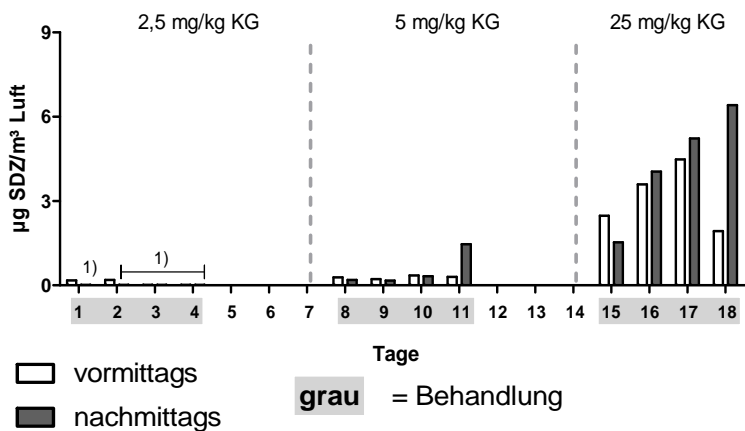


Abb. 4-14: Vergleich des Sulfadiazineintrages in die Stallaerosole – vormittags vs. nachmittags. Jeweils vormittags und nachmittags fand eine Fütterung/Behandlung statt; 1) ≤ BG; BG = 0,1 µg/mL.

4.5.2 Pelletfütterung

Sulfadiazin wurde in der bestimmungsgemäßen Konzentration von 25 mg/kg Körpergewicht enthalten in Pellets an die Tiere verfüttert. Der Sulfadiazingehalt in den Pellets betrug ca. 820 mg/kg Futter.

4.5.2.1 Plasma

Die im Plasma detektierten Sulfadiazinkonzentrationen sind in Abb. 4-15 dargestellt. Die erreichten Plasmakonzentrationen lagen im Bereich von 4,6-11,4 µg SDZ/mL Plasma.

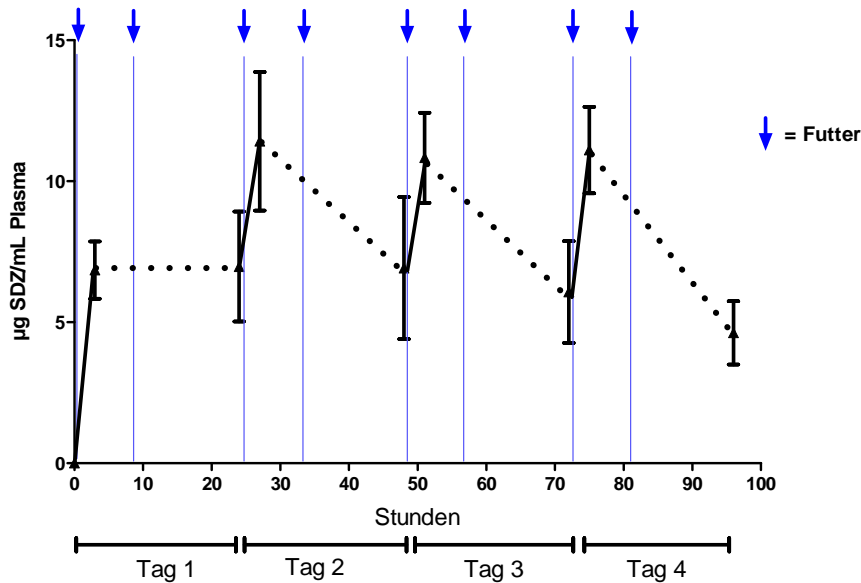


Abb. 4-15: Sulfadiazin-Konzentration im Plasma nach Pelletfütterung von 25 mg/kg KG; die Fütterung erfolgte 2 x täglich über 4 Tage (Mittelwert und Standardabweichung von sechs Schweinen).

4.5.2.2 Urin

In Abb. 4-16 werden die im Urin detektierten Sulfadiazin-Konzentrationen nach Pelletfütterung von 25 mg/kg KG dargestellt. Über die ersten drei Tage kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Sulfadiazinkonzentration beginnend am ersten Tag der Behandlung mit 83,5 µg SDZ/mL Urin. Am dritten Behandlungstag wurde ein Maximalwert von etwa 340,0 µg SDZ/mL Urin erreicht, der am vierten Behandlungstag bestehen blieb. Einen Tag nach Abschluss der Behandlung sank der Sulfadiazingehalt im Urin auf 140,0 µg/mL.

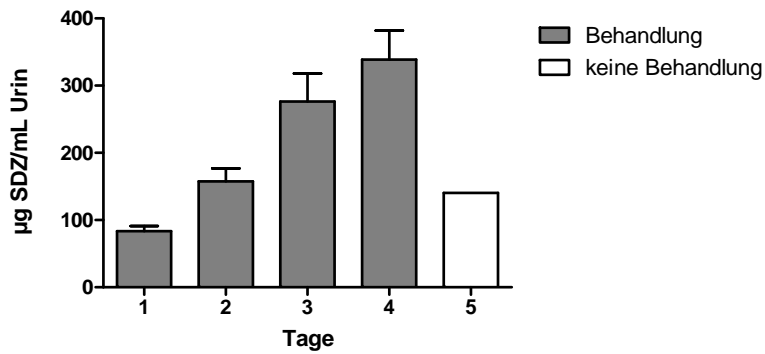


Abb. 4-16: Sulfadiazin-Konzentration im Urin nach Pelletfütterung von 25 mg/kg KG; die Fütterung erfolgte 2 x täglich über 4 Tage; der weiße Balken signalisiert die fehlende Fütterung an Tag 5 (Mittelwert und Standardabweichung von sechs Schweinen).

4.5.2.3 Sedimentationsstaub

Die Untersuchung von Sedimentationsstaubproben aus fünf unterschiedlichen Bereichen des Stalles zeigte, dass sich während der Pelletfütterung innerhalb der Behandlungstage nachweisbare Mengen an Sulfadiazin im Staub befanden. An allen Lokalisationen mit Ausnahme des Bereiches der Fensterbank ließ sich ein Anstieg des Sulfadiazingehaltes im Stallstaub während der Behandlungsdauer erkennen. Dies trifft ebenfalls auf die gemessenen Werte an Tag fünf zu, an dem keine Behandlung stattfand. Abb. 4-17 zeigt die Ergebnisse.

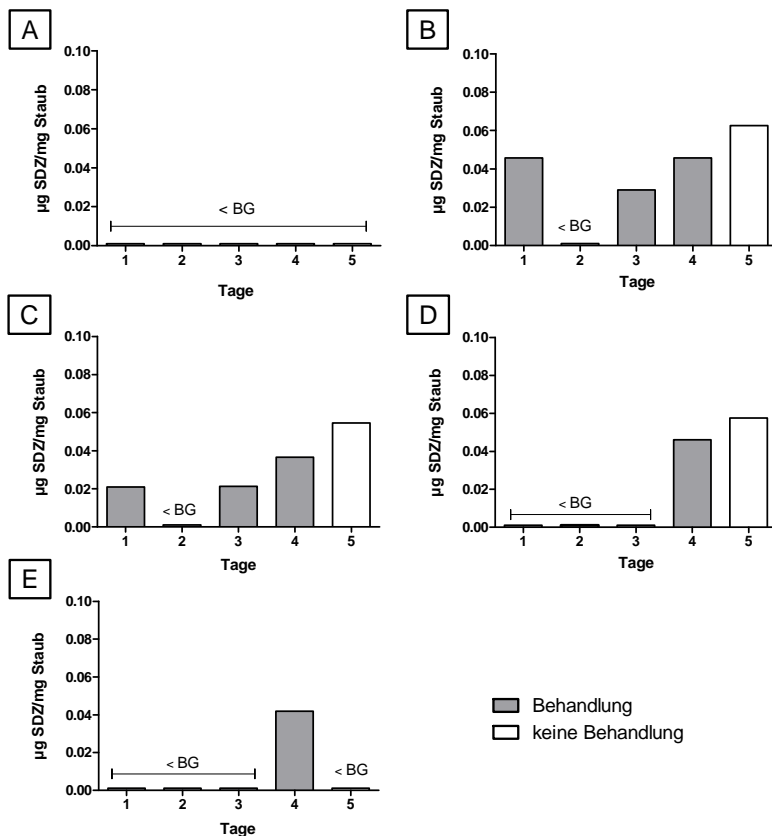


Abb. 4-17: Konzentration an Sulfadiazin (SDZ) im Sedimentationsstaub im Bereich der Fensterbank (A), des Troges (B), der Liegefläche (C), der Rinne (D) und gegenüber auf der anderen Seite der Stallgasse (E) während der Pelletfütterung; die weißen Balken signalisieren das Fehlen der Sulfadiazin-Fütterung an Tag 5; BG = 0,1 µg/mL.

4.5.2.4 Filterstaub

Während der Verfütterung von pelletiertem Futter konnte Sulfadiazin im Aerosol zum größten Teil nur unterhalb der BG = 0,1 µg/mL ermittelt werden. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tab. 4-1 dargestellt.

Tab. 4-1: Sulfadiazingehalt im Aerosol nach Verabreichung von 25 mg/kg KG Sulfadiazin über 4 Tage (2 x täglich) über das Pelletfutter; an Tag 5 fand keine Sulfadiazin-Fütterung mehr statt; BG = 0,1 µg/mL.

Tag	µg SDZ/m ³ Luft
1	< BG
2	< BG
3	< BG
4	0,18
5 (keine Behandlung)	Nicht gemessen

Zur Überprüfung des Sulfadiazingehaltes in der Stallluft in Abhängigkeit von der Tageszeit wurden vergleichende Messungen vormittags und nachmittags durchgeführt. Auch hier blieb der Sulfadiazingehalt in den Aerosolen zum größten Teil unterhalb der BG. Beide Messintervalle enthielten jeweils

einen Fütterungszeitpunkt, jedoch war keine kontinuierliche Sulfadiazinverteilung ermittelbar. Die Ergebnisse hierzu sind in Tab. 4-2 dargestellt.

Tab. 4-2: Vergleich des Sulfadiazineintrages in die Stallaerosole während des Vormittags vs. Des Nachmittags. Es wurden 25 mg/kg KG Sulfadiazin über 4 Tage (2 x täglich) über das pelletierte Futter verabreicht; an Tag 5 fand keine Sulfadiazin-Fütterung mehr statt; BG = 0,1 µg/mL.

Tag	Tageszeit	µg SDZ/m ³ Luft
1	vormittags	< BG
	nachmittags	< BG
2	vormittags	< BG
	nachmittags	< BG
3	vormittags	< BG
	nachmittags	< BG
4	vormittags	< BG
	nachmittags	0,29

4.6 Zusammenfassung

Unter dem Aspekt, dass Sulfonamide photooxidierbar sind, wurde die Photodegradation neun verschiedener Sulfonamide untersucht und mittels HPLC detektiert. Unter UVA/UVB-Licht-Irradiation werden Sulfanilamid und Sulfathiazol hochgradig degradiert, während Sulfamethoxyipyridazin, Sulfachloropyridazin, Sulfamerazin, Sulfamethazin, Sulfadimethoxin, Sulfamethoxazol sowie Sulfadiazin mittel- bis geringgradig abgebaut werden. Vergleichende Untersuchungen zwischen eingesetztem UVA/UVB-Licht sowie UVA-Strahlung veranschaulichen, dass die Wellenlänge die Degradationsrate beeinflusst. Auch bei Sonnenlichtexposition unter Feldbedingungen führt diese bei den einzelnen Sulfonamiden zu unterschiedlich starkem Photoabbau.

Die Photooxidationsprodukte wurden anschließend hinsichtlich ihrer Biokompatibilität untersucht (Tab. 4-3). Mittels Vitalitätsassay sowie Proliferationsassay konnte gezeigt werden, dass die Photodegradationsprodukte, entstanden aus einer unbestrahlten Sulfonamidlösung in einer ursprünglichen Konzentration von 50 µg/mL, nicht toxisch wirken und die Zellproliferation nicht negativ beeinflussen. Lediglich die Photooxidationsprodukte von Sulfathiazol, Sulfachloropyridin und Sulfanilamid beeinflussten geringgradig aber mit statistischer Signifikanz die Vitalität oder Proliferation der untersuchten Zellen.

Zur Detektion der antibakteriellen Aktivität der Degradationsprodukte wurde ein modifizierter Brillantschwarz-Reduktionstest verwendet. Die Ergebnisse dokumentieren, dass die Photooxidation den Verlust der antibakteriellen Aktivität verursacht.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Wahl der Futterformulierung die Staubentwicklung und damit korrelierend den Arzneimitteleintrag im Stall erheblich beeinflusst. Sechs Schweine wurden jeweils über vier Tage mit Mehlfutter, in das Sulfadiazin als Testsubstanz eingemischt wurde, gefüttert. Der Sulfadiazin Gehalt wurde im Plasma und im Urin, in Sedimentationsstäuben sowie in Stallaerosolen bestimmt. Entsprechend wurde ein Versuch mit pelletiertem Futter durchgeführt. Die detektierten Sulfadiazin Gehalte in den Sedimentationsstäuben sowie Aerosolen waren während der Pelletfütterung deutlich geringer im Vergleich zur Mehlfütterung.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass die orale Medikation über das Futter zu einer Arzneimittelverschleppung im Stall führt. Für diesen Versuch wurde sechs Schweinen über

einige Tage Sulfadiazin über das Futter verabreicht, nach Abschluss der Behandlung wurden die Tiere ausgestallt und die Bucht trocken gereinigt. Nachfolgend wurden unbehandelte Schweine in die gleiche Bucht eingestallt. Diese Tiere wiesen über mehrere Tage nachweisbare Sulfadiazingehalte im Plasma und Urin auf. Auch in den Sedimentationsstäuben sowie Aerosolen ließ sich Sulfadiazin detektieren.

Die Ergebnisse dieser Studie demonstrieren, dass bei der oralen Medikation durch die Wahl einer staubarmen Futterformulierung, sowohl die Staubentwicklung per se als auch der Sulfadiazineintrag in die Stallumgebung deutlich reduziert werden kann. Dies mindert zum einen die gesundheitliche Belastung von Mensch und Tier und ist durch die Verschleppung subtherapeutischer Dosen auch im Hinblick auf Resistenzentwicklungen ein wichtiger Aspekt. Infolge einer verminderten Staubproduktion im Tierstall wird der Arzneimiteleintrag über das Abluftsystem in die Umwelt reduziert.

Tab. 4-3: Bewertung der Sulfonamide auf Basis ihrer Photoabbaubarkeit und der antibakteriellen Aktivität der entstandenen Metabolite.

Test auf...	SGU	SDZ	SPY	STZ	SMR	SMZ	SMPD	SCY	SMX	SDM	SAD
Photoabbau-Produkte: Wirkung auf Eukaryot. Zellen	n. u.		n. u.								
Antibakterielle Aktivität der Metaboliten	n. u.		n. u.								
% Abbau nach 6h UVA/UVB	n. u.	27	n. u.	96	26	29	71	69	28	22	98
% Abbau nach 7 Tagen Sonnenlicht	n. u.	28	n. u.	96	34	44	67	75	50	30	82
Abbau durch UV-Licht	n. u.		n. u.								

SGU: Sulfaguanidin; SDZ: Sulfadiazin; SPY: Sulfapyridazin; STZ: Sulfathiazol; SMR: Sulfamerazin; SMZ: Sulfamethazin; SMPD: Sulfamethoxypropyridazin; SCY: Sulfachloropyridazin; SMX: Sulfamethoxazol; SDM: Sulfadimethoxin; SAD: Sulfanilamid; n. u.: nicht untersucht; grün: positiv zu bewerten, rot: negativ zu bewerten; gelb: Bewertung nicht eindeutig

5 Biologische Abbaubarkeit und QSAR (Universität Lüneburg ehemals Freiburg)

5.1 Sulfonamid-Analytik

Für die im Projekt ausgewählten Sulfonamide wurde ausgehend von Vorarbeiten (Hamscher et al. 2005) eine substanzspezifische Analytik entwickelt, um begleitend zu den biologischen Abbautests den Verbleib der Sulfonamide näher untersuchen zu können und um die dadurch für QSAR (Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen) erzeugten Daten nochmals zusätzlich absichern zu können. Eine biotische oder abiotische Primärelimination, die nur auf geringfügigen Veränderungen in der Molekülstruktur beruht, wie beispielweise dem Einbau eines O-Atoms in eine C-H-Bindung, bleibt in biologischen Abbautests unerkant. Für die Sulfonamid-Analyse wurden daher zu Beginn und am Ende der biologischen Abbautests Proben entnommen und bis zu ihrer Analyse bei -80 °C gelagert.

Mit Hilfe der HPLC-UV-Vis-Methode (5.1.2) ist es möglich, die Primärelimination der Muttersubstanz zu erkennen und entstandene Transformationsprodukte zunächst grob zu charakterisieren.

Zur weiterführenden Strukturaufklärung entstandener Transformationsprodukte wurde eine LC-MS/MS-Methode etabliert (5.1.3). Die im Folgenden beschriebene Probenvorbereitung (5.1.1) dient der Extraktion und Aufreinigung von Sulfonamiden aus komplexen Matrices sowie der Aufreinigung der Proben für die LC-MS/MS.

Die unterschiedlichen Matrices in den biologischen Abbautests störten die Sulfonamid-Analyse in den jeweils eingesetzten Konzentrationen nicht. Auf eine vorgeschaltete Probenaufreinigung konnte daher teilweise verzichtet werden.

5.1.1 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung dient der Probenaufreinigung vor der Sulfonamid-Analyse.

5.1.1.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Biogassubstrat wurde mit neun Sulfonamiden in einer Konzentration von je 10 µg/mL dotiert. Von dem dotierten Substrat wurde 1 mL entnommen, mit 1,2 mL Citronensäurepuffer (pH 5) für 1 min kräftig gemischt (Vortex) und anschließend zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Hierfür wurden zunächst 6 mL Ethylacetat zugegeben, die Probe für 1 min kräftig gemischt (Vortex) und für weitere 15 min geschüttelt (KS 501 digital, IKA Labortechnik, Staufen). Anschließend erfolgte eine weitere Extraktion mit 3 mL Ethylacetat. Nach vollständiger Eindampfung der organischen Phase wurden die Sulfonamide in 1 mL Methanol/Millipore-Wasser (10:90 v/v) rückgelöst und in die Festphasenextraktion gegeben.

5.1.1.2 Festphasenextraktion (SPE)

Die Festphasenextraktion (SPE) wurde mit ISOLUTE ENV+ -Kartuschen (200 mg/6 mL, stark quervernetztes hydroxyliertes Polystyrol-Divinylbenzol Co-Polymer, Biotage, Uppsala, Schweden) unter Anlegen eines Vakuums bei einem Druck von ca. 190 mbar durchgeführt (Membran-Vakuumpumpe MZ 2C, Vacuubrand GMBH & Co KG, Wertheim). Die Kartuschen wurden zunächst mit 10 mL Methanol (mit Essigsäure auf pH 2,5 eingestellt), dann mit 5 mL Methanol konditioniert und mit 12 mL

eines 0,5 M Zitronensäurepuffers (pH 5) equilibriert. Die aus der Flüssig-Flüssig-Extraktion erhaltene Probe (5.1.1.1) von 1 mL wurde mit 4 mL eines 1 M Zitronensäurepuffers versetzt (pH 5), für 2 min ins Ultraschallbad gestellt und mit einer Flussrate von 2 mL/min auf die Kartusche gegeben. Anschließend wurde die beladene Kartusche mit 10 mL Reinstwasser gewaschen. Die Elution der Sulfonamide erfolgte mit 10 mL Methanol. Das Eluat wurde vollständig eingedampft und der Rückstand in 1 mL 0,1 %-iger Ameisensäure/100 % Acetonitril (90:10 v/v) aufgenommen (Khaleel et al. 2013).

Die Wiederfindungsraten der Sulfonamide nach der Probenvorbereitung wurden ermittelt, indem das sulfonamidfreie Biogassubstrat mit neun Sulfonamiden in einer Konzentration von je 10 µg/mL dotiert und der oben beschriebenen Probenvorbereitung unterzogen wurde (Tab. 5-1).

Tab. 5-1: Mittlere Wiederfindungsraten (n = 3) der Sulfonamide (10 mg/L) in Biogassubstrat nach Probenvorbereitung mit Flüssig-Flüssig-Extraktion und SPE.

Substanz	Wiederfindung in %	Relative Standardabweichung in ± %
Sulfanilamid	90,6	5,9
Sulfadiazin	95,5	6,9
Sulfathiazol	88,1	6,2
Sulfamerazin	112,6	6,2
Sulfamethazin	94,0	6,6
Sulfamethoxyridazin	88,8	6,5
Sulfachloropyridazin	99,3	7,2
Sulfamethoxazol	96,9	7,4
Sulfadimethoxin	99,9	7,7

5.1.2 HPLC UV-Vis

Die HPLC-Anlage (Shimadzu, Duisburg) bestand aus folgenden Komponenten: dem PC-Softwarepaket Class LC10, dem Kommunikationsmodul CBM-20 A, zwei LC-20 AT VP-Pumpen, dem Autosampler SIL-20 AC HT, dem Säulenofen CTO-20 AC VP und dem Diodenarray SPD-M20. Die chromatographische Auftrennung erfolgte über eine RP-18-Säule (CC 125/4 NUCLEODUR 100-5 C18 ec, Macherey and Nagel, Düren), als Vorsäule diente eine CC 8/4 HYPERSIL 100-3 (ODS)C18 ec. Von der Probe wurden 20 µL injiziert. Die Elution erfolgte mit 0,1 %-iger wässriger Ameisensäure und 100 % Acetonitril über einen linearen Gradienten: 0 min 1 % B, 4 min 10 % B, 11.50 min 20 % B, 13 min 30 % B, 15 min 45 % B, 18 min 50 % B, 23 min 1 % B, 28 min 1 % B bei einer Flussrate von 0,7 mL/min. Die Ofentemperatur betrug 25 °C und die Detektionswellenlänge 270 nm.

Gradientenelution: Mit dieser Gradientenelution (GE-1) lassen sich von den 11 Sulfonamiden 7 Substanzen chromatographisch gut in einem Lauf trennen. Sulfaguanidin-Monohydrat und Sulfanilamid eluieren aufgrund ihrer Polarität mit sehr kurzen Retentionszeiten (Abb. 5-1a, Peak 1 und 2), Sulfathiazol und Sulfapyridin eluieren gemeinsam (Abb. 5-1a, Peak "4 & 5"). Eine vollständige Trennung von Sulfathiazol und Sulfapyridin gelang entweder durch die Gradientenelution GE-2 (Abb. 5-1b) oder durch eine isokratische Elution (Abb. 5-1c). GE-2 unterschied sich von GE-1 nur durch eine höhere Ofentemperatur von 40 °C und eine niedrigere Flussrate von 0,5 mL/min, ermöglichte allerdings keine vollständige Trennung von Sulfamethazin und Sulfamethoxyridazin (Abb. 5-1b, Peak 7 & 8).

Dieselben Effekte zeigte die **isokratische Elution** (s. u.), allerdings mit dem Nachteil gegenüber GE-2, dass Sulfadimethoxin innerhalb von 50 min nicht detektiert werden konnte (Abb. 5-1c). Die isokratische Auftrennung von Sulfathiazol und Sulfapyridin erfolgte mit 0,1 %-iger wässriger Ameisensäure und 100 % Acetonitril (90:10 v/v) als Laufmittel. Das Injektionsvolumen betrug 10 µL, die Flussrate 0,35 mL/min bei einer Ofentemperatur von 50 °C. Die Detektion erfolgte über 20 min bei 270 nm.

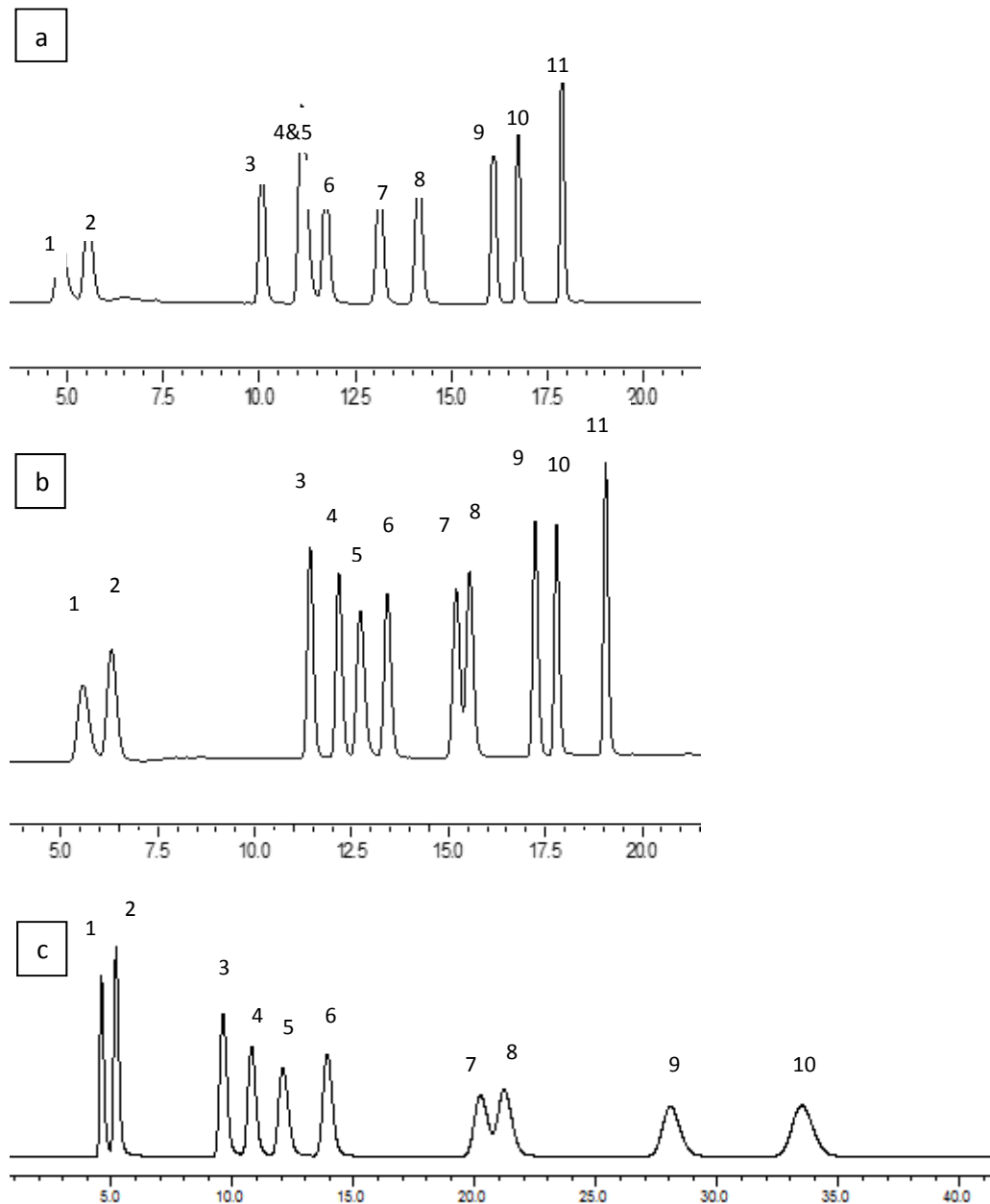


Abb. 5-1: Chromatographische Auftrennung (UV-Vis-Detektion) der Sulfonamide in einer Konzentration von 4 mg/L mit Gradientenelution GE-1 (a) und GE-2 (b) und isokratischer Elution (c); 1-Sulfaguandin-Monohydrat, 2-Sulfanilamid, 3-Sulfadiazin, 4-Sulfathiazol, 5-Sulfapyridin, 6-Sulfamerazin, 7-Sulfamethazin, 8-Sufamethoxyipyridazin, 9-Sulfachloropyridazin, 10-Sulfamethoxazol, 11-Sulfadimethoxin.

Die chromatographische Auftrennung der elf Sulfonamide in einer Konzentration von 4 mg/L mit HPLC und UV- Detektion wurde für die Gradientenelutionen GE-1 und GE-2 nach USP (The United States Pharmacopeia 30) näher charakterisiert (Mahmoud et al. 2013).

In Anlehnung an die International Conference on Harmonization (1996) wurde die HPLC-UV/Vis-Detektion evaluiert. Die Linearität der HPLC-UV/Vis-Detektion wurde für den niedrigen Konzentrationsbereich von 0,25 – 5 mg/L (7 Konzentrationen) und für den gesamten Konzentrationsbereich von 0,17 – 150 mg/L (8 Konzentrationen) bestimmt, indem jede Konzentration dreimal gemessen und über die Peakflächen die Kalibrationsgeraden erstellt und die lineare Regressionen berechnet wurden. Die Sulfonamid-Analyse erwies sich im unteren Konzentrationsbereich mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 von mindestens 0,9984 (Sulfamerazin) und im gesamten Konzentrationsbereich bis 150 mg/L mit R^2 von mindestens 0,9925 (Sulfachloropyridazin) als linear (Tab. 5-2). Die hohen Konzentrationen waren insofern relevant, da die Ausgangskonzentration der Sulfonamide in den anaeroben Abbautests im Bereich von 100 mg/L lag und auch hier die Primärelimination analytisch untersucht werden sollte.

Tab. 5-2: Charakteristika der Kalibrationsgeradengleichungen (NWG: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze).

Sulfonamid	R^2		NWG mg/L	BG mg/L
	0,25-5 mg/L	0,17-150 mg/L		
Sulfaguanidin-Monohydrat (SGU)	1,0000	0,9995	0,10	0,25
Sulfanilamid (SAD)	0,9998	0,9991	0,10	0,25
Sulfadiazin(SDZ)	0,9999	0,9962	0,05	0,10
Sulfathiazol(STZ)	0,9999	0,9994	0,05	0,10
Sulfapyridin(SPY)	0,9995	0,9981	0,05	0,10
Sulfamerazin(SMR)	0,9984	0,9988	0,05	0,10
Sulfamethazin (SMT)	0,9999	0,9994	0,05	0,10
Sulfamethoxypyridazin (SMPD)	0,9999	0,9996	0,05	0,10
Sulfachloropyridazin (SCP)	0,9998	0,9925	0,05	0,10
Sulfamethoxazol (SMX)	0,9997	0,9992	0,02	0,05
Sulfadimethoxin (SDX)	0,9999	0,9986	0,02	0,05

Die Präzision der HPLC-UV/Vis-Detektion wurde durch 3-fache Injektion von Standards in den Konzentrationen 0,25/2/5 mg/L bzw. 10-fache Injektion im Bereich von 100 mg/L innerhalb eines Tages gemessen sowie durch die Injektion der Standards an verschiedenen Tagen. Die Reproduzierbarkeit wurde als relative Standardabweichung (RSD) der Konzentration ausgedrückt. Für die Messungen im niedrigen Konzentrationsbereich lag die Variation innerhalb eines Tages im Bereich von 0,05-7,21 % RSD und für Messungen an drei aufeinander folgenden Tagen zwischen 0,1 und 4,6 % RSD (Mahmoud et al. 2013). Für Konzentrationen im Bereich von 100 mg/L lag die relative Standardabweichung innerhalb eines Tages (10 Messungen) zwischen 0,40 und 3,85 % RSD und für 4 Messungen innerhalb von drei Wochen zwischen 0,08 und 3,72 % RSD.

Die Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen wurden für jedes Sulfonamid experimentell bestimmt, indem die Standardlösung soweit verdünnt injiziert wurde, bis das Signal/Rausch-Verhältnis 3 (NWG) bzw. 10 (BG) betrug. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen lagen mindestens bei 0,02 und 0,05 mg/L (Mahmoud et al. 2013). Somit war die Sensitivität der Methode groß genug,

um den Verbleib der Sulfonamide und die Entstehung möglicher Abbauprodukte begleitend zu den biologischen Abbautests, auch im CBT mit Testkonzentrationen von 2-10 mg/L, untersuchen zu können.

5.1.3 LC-UV-MS/MS

Zusätzlich zu der HPLC-Methode mit optischer Detektion wurde eine LC-MS Methode etabliert, um im Falle eines unvollständigen Abbaus detailliertere Strukturinformationen über Transformationsprodukte zu erhalten. Diese Proben wurden mit einer HPLC der Agilent 1100-Serie, bestehend aus 2 Pumpen G1312A, dem Autosampler ALS G1329A+ALS Therm G1330B, dem Ofen G1316A einem Entgaser G1322A und einem UV/Vis Detektor MWD G1365B (Agilent, Böblingen), gekoppelt mit einem Bruker Daltonic Esquire 6000+ Ion-trap-Massenspektrometer mit Elektrospray-Ionisierung analysiert. Die Daten wurden mit der Software Data-Analysis V.4.0 von Bruker ausgewertet (Bruker Daltonic GmbH, Bremen). Die chromatographische Auftrennung erfolgte mit GE-2, die massenspektrometrische Messung wurde im Positivmodus durchgeführt (Tab. 5-3).

Tab. 5-3: MS-Parameter.

End plate Offset	-500 V
Nebulizer pressure	30,0 Psi (206 kPa)
Trockengas Fluss	12 L/min
Trockengas Temperatur	350 °C
Kapillarspannung	-3917 V
Ion Charge Control settings:	
target	4000
Scan range	40-1000m/z
accumulation time	200ms
Selected lens and block voltages	+116,7 V Kapillarausgang +6,4 V octopole 1 +1,92 V octopole 2 170 Vpp octopole reference amplitude 33,4 V skimmer 62,2 trap drive -6,0 V lens 1 -73,0 V lens 2

5.2 Biologische Abbaubarkeit von Sulfonamiden

Die Sulfonamide wurden sowohl auf ihre aerobe als auch auf ihre anaerobe biologische Abbaubarkeit getestet. Zur Untersuchung der aeroben biologischen Abbaubarkeit wurden zwei Tests der OECD-Testserie 301 zur Prüfung der leichten biologischen Abbaubarkeit organischer Substanzen ausgewählt: der Closed Bottle Test (CBT) und der Manometrische Respirationstest (MRT). Die anaerobe Abbaubarkeit wurde sowohl mit Faulschlamm als auch mit Biogassubstrat in Anlehnung an DIN (1998) untersucht.

5.2.1 Closed Bottle Test (OECD 301D)

Der CBT ist in der OECD-301-Testserie (1992) der erste von sechs Tests zur Untersuchung der leichten biologischen Abbaubarkeit organischer Substanzen und ist auch für schwer wasserlösliche Substanzen geeignet. Die Testsubstanz, die die einzige Kohlenstoffquelle darstellt, liegt in geringer Konzentration (2-10 mg/L bzw. 5-10 mg des theoretischen Sauerstoffbedarfs pro Liter (ThOD/L)) vor, so dass keine Verluste der Testsubstanz durch Sorptionseffekte und Wechselwirkungen mit anderen Organika vorkommen (Tiede et al. 2009; Frimmel und Niessner 2010). Die aus dem Kläranlagenablauf stammenden Mikroorganismen liegen ebenfalls in geringer Konzentration vor (10^4 - 10^6 Zellen/L). Substanzen, die im CBT zu mehr als 60 % ThOD abgebaut werden, gelten als „biologisch leicht abbaubar“.

Die Aktivität des Inokulums wird über die Qualitätskontrolle erfasst, in der innerhalb von 14 Tagen ein Abbau der Referenzsubstanz von 60 % gefordert wird. Über die Toxizitätskontrolle ist eine wachstumshemmende bzw. toxische Wirkung der Testsubstanz auf das Inokulum sichtbar, die falsch negative Abbauergebnisse zur Folge hätte. Eine toxische Wirkung der Testsubstanz auf die Mikroorganismen kann ausgeschlossen werden, wenn der Abbau in der Toxizitätskontrolle, die sowohl Natriumacetat als auch die Testsubstanz enthält, nach 14 Tagen mindestens 25 % Abbau [ThOD] beträgt. Die Differenz der Sauerstoffverbräuche in den parallelen Testansätzen darf nach 28 Tagen nicht mehr als 20 % betragen.

Der Test bestand aus den Ansätzen A-D (Tab. 5-4) und wurde zweimal im Doppelansatz durchgeführt (n = 4). Das Inokulum stammte aus dem Ablauf der kommunalen Kläranlage Kenzingen (13.000 Einwohnergleichwerte (EWG)). Der Test wurde bei 20 ± 1 °C über 28 Tage im Dunkeln durchgeführt. Der Abbau wurde über die Sauerstoffabnahme in den geschlossenen Flaschen nach ISO 5414 (1990) mit Hilfe von Sensorspots und eines faseroptischen Sauerstoffsensors (Fibox 3 PreSens, Regensburg) gemessen (Friedrich et al. 2013).

Tab. 5-4. Zusammensetzung der Ansätze im CBT (A-D) und MRT (A-E).

Ansatz	A Blind- ansatz	B Qualitäts- kontrolle	C Test- Ansatz	D Toxizitäts- kontrolle	E Steril- ansatz
Mineralmedium	+	+	+	+	+
Inokulum	+	+	+	+	-
Testsubstanz	-	-	+	+	+
Referenzsubstanz (Natriumacetat)	-	+	-	+	-
Natriumazid	-	-	-	-	+

Im CBT wurden neben den elf Sulfonamiden weitere 60 strukturähnliche Substanzen untersucht, um nach den ersten negativen Abbauergebnissen die Datenbasis für die Untersuchung Quantitativer Struktur-Wirkungs-Beziehungen (QSAR) zu erweitern.

Nach den Richtlinien der OECD wurden für alle elf Sulfonamide und 58 der strukturverwandten Substanzen valide Ergebnisse erzielt. Alle elf untersuchten Sulfonamide sind anhand der CBT-Ergeb-

nisse als nicht leicht biologisch abbaubar einzustufen (Tab. 5-5) und zeigten vergleichbare Abbaukurven wie Sulfadiazin (Abb. 5-2). Anhand der substanzbegleitenden Analytik konnte kein Primärabbau nachgewiesen werden (Abb. 5-3). Von den 58 valide getesteten strukturverwandten Substanzen war nur Natriumcyclamat mit einem Abbau von 86 % biologisch leicht abbaubar, alle anderen Substanzen erwiesen sich wie die Sulfonamide als nicht leicht biologisch abbaubar (gefordert > 60 % Abbau bezogen auf den ThOD; alle < 25 % Abbau (ThOD)).

Toxische Effekte konnten für keine der untersuchten Substanzen festgestellt werden, da der Abbau in der Toxizitätskontrolle an Tag 14 immer mindestens 25 % [ThOD] betrug.

Tab. 5-5. Prozentualer Abbau (% ThOD) der Sulfonamide im CBT (Mittelwert der Parallelansätze aus zwei CBTs).

Substanz	Abbau in Prozent	
	Mittelwert (n = 4)	Standardabw. in ± %
Sulfaguanidin-Monohydrat	-1,2	7,1
Sulfanilamid	-2,7	5,2
Sulfadiazin	-0,6	9,7
Sulfathiazol	-3,8	6,6
Sulfapyridin	0,4	3,9
Sulfamerazin	-4,0	7,9
Sulfadimidin (= Sulfamethazin)	-2,6	8,7
Sulfamethoxypyridazin	-1,9	2,3
Sulfachloropyridazin	2,1	1,5
Sulfamethoxazol	-1,1	8,8
Sulfadimethoxin	-0,1	9,7

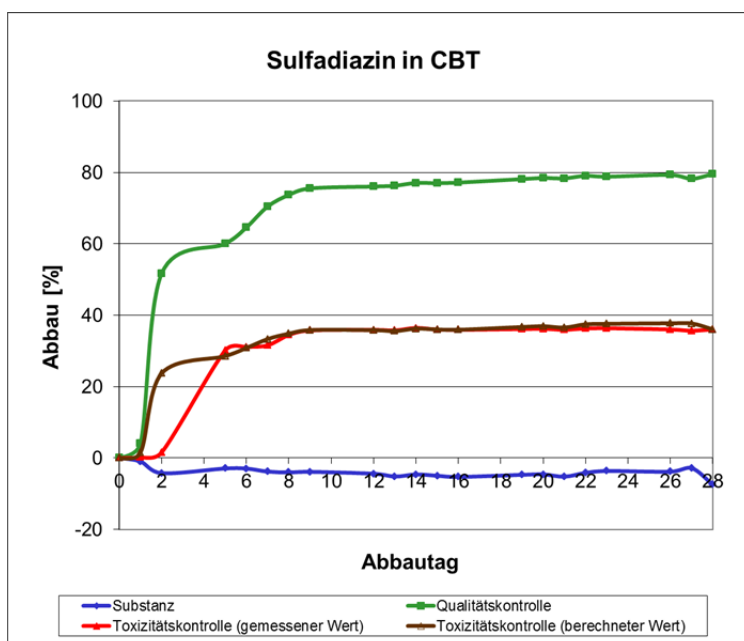


Abb. 5-2: CBT mit Sulfadiazin in einer Konz. von 3,9 mg/L (5 mg/L ThOD): prozentualer Abbau im Testansatz mit Sulfadiazin (blau), in der Toxizitätskontrolle mit Sulfadiazin und Natriumacetat (rot: gemessen, braun: berechnet) und in der Qualitätskontrolle mit Natriumacetat (grün), n = 2.

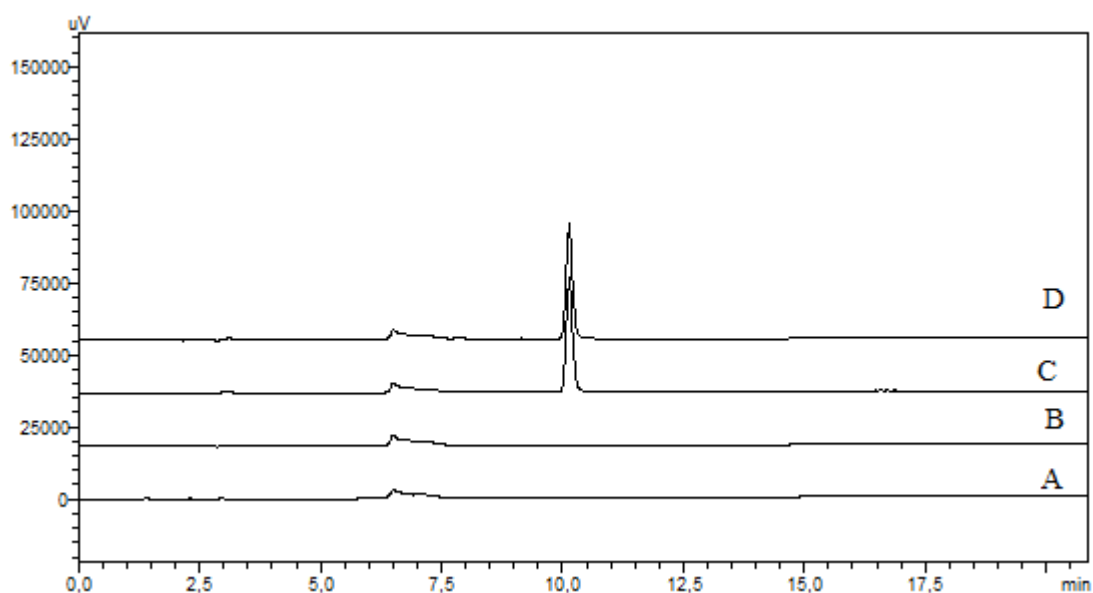


Abb. 5-3: CBT mit Sulfadiazin in einer Konzentration von 3,9 mg/L (5 mg/L ThOD): HPLC-Chromatogramme vom Blindwert am Tag 0 (A) und Tag 28 (B), sowie vom Testansatz am Tag 0 (C) und Tag 28 (D).

5.2.2 Manometrischer Respirationstest (OECD 301F)

Der MRT ist ein weiterer Test der OECD 301-Testserie zur Bestimmung der leichten biologischen Abbaubarkeit (1992). Im Unterschied zum CBT wird die Abbaubarkeit der Testsubstanz in einer 10-fach höheren Konzentration (bis 100 mg/L) und bei einer höheren Inokulumdichte (10^7 - 10^8 Zellen/L) untersucht. Der Testaufbau gleicht dem des CBTs (Tab. 5-4), nur dass über eine Sterilkontrolle zusätzlich eine abiotische Elimination erfasst wird. Der Test ist gültig, wenn in den ersten 14 Tagen die Referenzsubstanz in der Qualitätskontrolle bezogen auf den ThOD zu mindestens 60 % abgebaut wird und der Abbau in der Toxizitätskontrolle mindestens 25 % [ThOD] beträgt. Daneben darf die Differenz der Abbauwerte in den parallelen Testansätzen nicht mehr als 20 % betragen und die Sauerstoffzehrung im Blindwert 60 mg/L nicht überschreiten.

Der MRT wurde bei 20 ± 1 °C unter ständigem Rühren über 28 Tage im Dunkeln durchgeführt. Die Testansätze wurden im Doppelansatz, der Blindwert und die Qualitätskontrolle im Dreifachansatz und die Toxizitätskontrolle und Sterilkontrolle je einfach angesetzt. Der biologische Abbau wurde über den Sauerstoffverbrauch und die daraus resultierende Druckabnahme in den Messköpfen (OxiTop OC110, WTW, Weilheim) gemessen, wobei gebildetes CO₂ mit Kaliumhydroxid abgefangen wurde.

Die elf Sulfonamide wurden zweimal in einer Testkonzentration von 30 mg/L [ThOD] auf ihre Abbaubarkeit getestet. Das Inokulum (80 mL Kläranlagenablauf) stammte einmal aus der kommunalen Kläranlage Kenzingen (13.000 EWG), das andere Mal von der Kläranlage in Lüneburg (Abwasser, Grün & Lüneburger Service GmbH, 250.000 EWG). Zusätzlich zu den elf Sulfonamiden wurden 58 strukturähnliche Substanzen mit einem der beiden Abläufe untersucht.

Für die Sulfonamide wurden im ersten MRT mit Ausnahme von SMPD (Abweichung der Doppelbestimmung > 20 %) valide Ergebnisse erzielt. SMPD wurde in einem weiteren Test valide getestet (Khaleel et al. 2013). Im zweiten MRT wurde keine Qualitätskontrolle mitgeführt. Da in allen Toxi-

zitätsansätzen aber am 14. Tag ein Abbau von mindestens 33 % erfolgte (Ausnahme Sulfamethazin: Abbau von 21,7 %), konnte über die Toxizitätskontrolle eine ausreichende Aktivität des Inokulums nachgewiesen werden. Der zweite MRT wurde daher in die Auswertung miteinbezogen. Für die 58 strukturverwandten Substanzen wurden 46 valide Ergebnisse erzielt. Acht Substanzen zeigten eine toxische Wirkung auf die Mikroorganismen (Abbau in der Toxizitätskontrolle < 25 % [ThOD]). Bei vier Substanzen verfehlte der Test aus anderen Gründen die Validitätskriterien.

Alle elf untersuchten Sulfonamide sind anhand der MRT-Ergebnisse als nicht leicht biologisch abbaubar einzustufen (Tab. 5-6) und zeigten vergleichbare Abbaukurven wie Sulfamerazin (Abb. 5-4). Anhand der Analytik konnte bei keinem Sulfonamid ein Primärabbau nachgewiesen werden (Sulfamerazin: Abb. 5-5). Von den 46 valide getesteten strukturverwandten Substanzen erwiesen sich mit Ausnahme von Natriumcyclamat (Abbau von 93 %) alle Substanzen als nicht leicht biologisch abbaubar (gefordert > 60 %; alle < 58 % (Saccharin)).

Tab. 5-6: Prozentualer Abbau ausgewählter Sulfonamide im MRT (negative Werte deuten auf einen geringen Blindwert hin, der in der Größenordnung von – 10 % in diesem Test häufig auftritt).

Substanz	Abbau in Prozent	
	Mittelwert (n=2)	Standardabw. in ± %
Sulfaguanidin Monohydrat	-13,7	4,0
Sulfanilamid	-32,8	8,5
Sulfadiazin	-11,4	4,6
Sulfathiazol	-12,6	9,5
Sulfapyridin	-2,7	3,9
Sulfamerazin	-8,1	3,8
Sulfadimidin (= Sulfamethazin)*	-1,6	/
Sulfamethoxyridazin	-13,6	5,4
Sulfachloropyridazin	-15,6	2,0
Sulfamethoxazol	-18,2	4,2
Sulfadimethoxin	-2,0	4,0

* n = 1

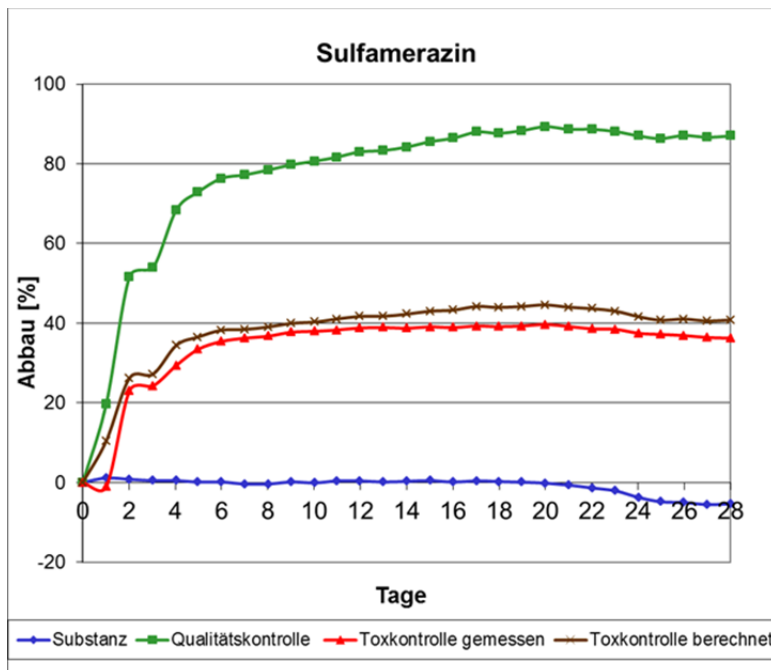


Abb. 5-4: MRT mit Sulfamerazin in einer Konz. von 21,5 mg/L (30 mg/L ThOD): prozentualer Abbau im Testansatz mit Sulfamerazin (blau), in der Toxizitätskontrolle mit Sulfamerazin und Natriumacetat (rot: gemessen, braun: berechnet) und in der Qualitätskontrolle mit Natriumacetat (grün), n = 2.

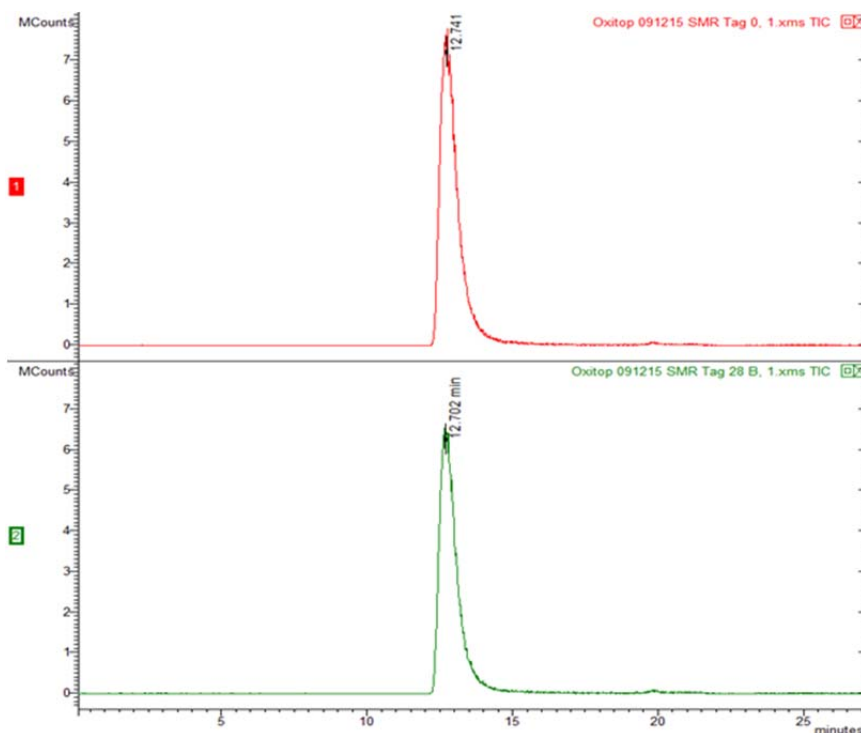


Abb. 5-5: CBT mit Sulfamerazin in einer Konzentration von 21,5 mg/L (30 mg/L ThOD): HPLC-Chromatogramme vom Testansatz am Tag 0 (rot) und Tag 28 (grün).

Zusammenfassend ergaben beide Abbautests zur Prüfung der leichten biologischen Abbaubarkeit unter aeroben Bedingungen, dass keines der elf Sulfonamide leicht abbaubar ist. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die Sulfonamide nach ihrem Eintrag in die Umwelt nicht abgebaut werden und sich in Böden und im Grundwasser/Oberflächengewässer anreichern können. Durch ihre Präsenz ist eine Induktion mikrobieller Resistenzen nicht auszuschließen. Unterschiede in der chemischen Struktur der Seitenkette von para-Amino-benzolsulfonamid haben entgegen der ursprünglichen Erwartung offensichtlich keinen Einfluss auf die biologische Abbaubarkeit, d. h. die Sulfonamidgruppe scheint nicht nur zentral für die antibiotische Wirkung zu sein, sondern unter den hier untersuchten Bedingungen auch die biologische Abbaubarkeit zu verhindern.

Für QSAR stehen nur für den CBT Bioabbau-Module zur Verfügung, die die experimentellen Ergebnisse bestätigten, dass die Sulfonamide aerob nicht abbaubar sind. Eine Erweiterung der vorhandenen Datenbasis mit den für die Sulfonamide hier gewonnenen experimentellen Ergebnissen des Closed Bottle Tests führt logischerweise dazu, dass Sulfonamide immer als nicht biologisch abbaubar vorhergesagt werden. Damit konnten an dieser Stelle mittels QSAR keine Vorschläge für Strukturvariationen gemacht werden. Um zu prüfen, dass die Sulfonamidgruppe wesentlich für die Nichtabbaubarkeit ist, wurden weitere strukturverwandte Substanzen, die eine Sulfonamidgruppe enthalten, im CBT auf ihre leichte biologische Abbaubarkeit untersucht. Zudem wurde der MRT durchgeführt, bei dem das Inokulum in höherer Konzentration vorliegt und somit auch eine höhere Diversität metabolischer Enzyme aufweist. Damit wurde die Rolle der Sulfamidgruppe nochmals überprüft. Für den MRT fehlen bislang Abbau-Module für QSAR, da nur wenige Daten verfügbar sind. Aus diesem Grund, und da es auch im MRT keine verbesserte Abbaubarkeiten gab, konnten auch für diesen Test QSAR-Vorhersagen nicht sinnvoll angewandt werden.

5.2.3 Anaerober Abbautest mit Faulschlamm

Die anaerobe Abbaubarkeit der Sulfonamide wurde in Anlehnung an die DIN (1998) mit Faulschlamm getestet.

Beim anaeroben Abbau wird organischer Kohlenstoff zu Biogas umgesetzt. Das entstehende Gasgemisch aus Methan und Kohlenstoffdioxid führt zum Druckanstieg in den gasdicht geschlossenen Messflaschen, welcher mittels OxiTop®-C Messköpfen (WTW, Weilheim) erfasst und über den gesamten Versuchszeitraum gespeichert wurde. Die Zusammensetzung der Ansätze im anaeroben Test war wie im CBT (Tab. 5-4) mit der Ausnahme, dass als Referenzsubstanz Polyethylenglykol (PEG 400) verwendet wurde.

Als Inokulum wurde gewaschener und vorgezehrter Faulschlamm mit geringem anorganischem Kohlenstoffanteil ($IC < 10 \text{ mg/L}$) aus der Kläranlage Forchheim (AZV Breisgauer Bucht, 600.000 EWG) verwendet. Der Faulschlamm wurde mit anoxischem Mineralsalz-Medium soweit verdünnt, dass der Trockensubstanzgehalt in allen Testgefäßen 1 – 3 g/L betrug. Die Sulfonamide wurden als Stammlösungen in die Testansätze zugegeben, so dass sie bezogen auf den organischen Kohlenstoffgehalt (OC) in einer Konzentration von 50 mg/L vorlagen.

Es wurden drei Blindwerte und drei Qualitätskontrollen mit Polyethylenglykol (PEG 400) als Referenzsubstanz angesetzt. Eine ausreichende Aktivität des Faulschlammes wurde über den Abbaugrad der Referenzsubstanz in der Qualitätskontrolle erfasst, der nach DIN mindestens 60 % betragen muss. Die Sulfonamide wurden im Dreifachansatz auf ihre anaerobe Abbaubarkeit untersucht. Toxische Effekte auf die Faulschlammmikroorganismen wurden über eine Toxizitätskontrolle erfasst, die die

Test- und Referenzsubstanz in gleicher Konzentration enthielt. Eine Hemmung der Sulfonamide auf die Mikroorganismen des Faulschlammes konnte über eine geringere Gasbildung in der Toxizitätskontrolle gegenüber der Qualitätskontrolle erfasst werden. Der Testansatz erfolgte in einem "Zelt" (COY Laboratory Products, Grass Lake, USA) unter Stickstoff/Wasserstoff-Atmosphäre, um anaerobe Bedingungen zu gewährleisten. Undichte Flaschen wurden durch den Farbumschlag des im Mineral-salzmedium enthaltenen Sauerstoffindikators Resazurin nach Rosa angezeigt und gingen nicht in die Auswertung ein. Die Fermentation dauerte 28 Tage bei 39 ± 1 °C. An den zwei folgenden Tagen wurde nach Ansäuern der Proben der Biogasgehalt in der Gasphase sowie das in der wässrigen Phase gebundene CO₂ bestimmt.

Mit Ausnahme von Sulfamethazin wurden alle Sulfonamide auf ihre anaerobe biologische Abbaubarkeit mit Faulschlamm untersucht. Die Tests waren gültig, da die Kontrollsubstanz in der Plateauphase einen Abbaugrad > 60 % erreichte. Fünf der getesteten Sulfonamide zeigten in einer Konzentration von 50 mg/L OC eine toxische Wirkung (Abbau PEG 400 in Toxizitätskontrolle < 60 % und Gasbildung < als in Qualitätskontrolle) auf den Faulschlamm (Tab. 5-7). Die Testergebnisse für die anderen Sulfonamide waren valide. Keines der Sulfonamide wurde innerhalb von 28 Tagen zu mehr als 15 bis 25 % anaerob abgebaut. Die Gasbildung ist in Abb. 5-6 exemplarisch für Sulfadiazin dargestellt.

Tab. 5-7: Prozentualer Abbau der Sulfonamide im anaeroben Abbau mit Faulschlamm; n. v. = nicht valide, da Abbau in Toxizitätskontrolle < 60 % bzw. Gasbildung in Toxizitätskontrolle < Qualitätskontrolle.

Substanz	Testansätze			Ergebnis im 10 %-Bereich	Toxizitätskontrolle
	Mess 1	Mess 2	Mess 3		
Sulfaguanidin-Monohydrat	7	3	-8	n. v.	19
Sulfanilamid	24	16	22	15 bis 25	92
Sulfadiazin	13	9	19	10 bis 20	97
Sulfathiazol	17	19	17	n. v.	20
Sulfapyridin	12	18	16	10 bis 20	83
Sulfamerazin	12	8	23	10 bis 20	96
Sulfamethoxy-pyridazin	18	-2	9	n. v.	8
Sulfachloropyridazin	8	-1	9	n. v.	30
Sulfamethoxazol	22	17	-6	10 bis 20	67
Sulfadimethoxin	3	3	-1	n. v.	6

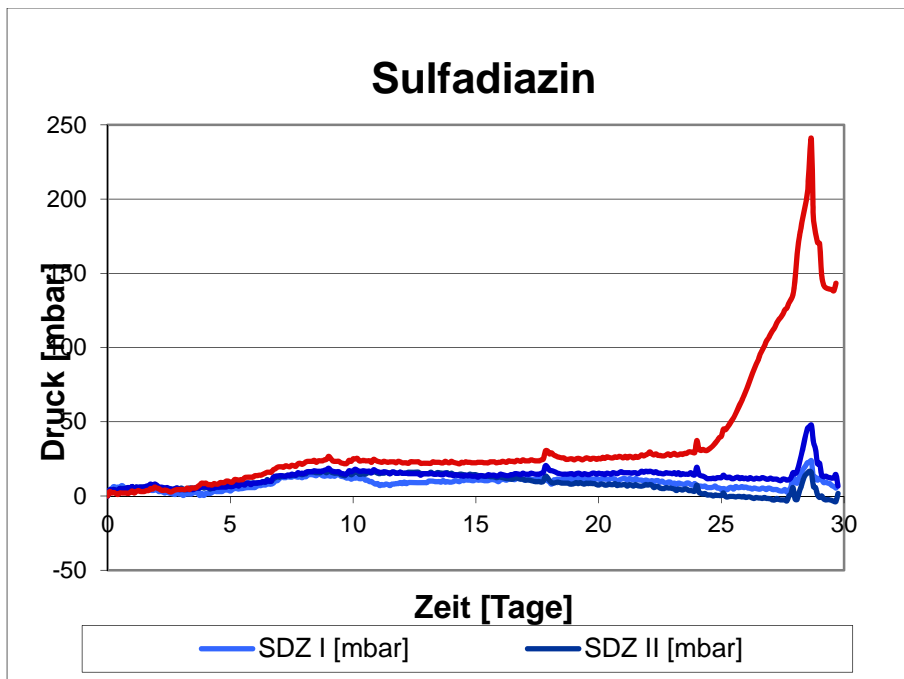


Abb. 5-6: Absolute Druckentwicklung von Sulfadiazin in einer Konzentration von 104 mg/L (50 mg/L OC) im anaeroben Abbautest mit Faulschlamm abzüglich der Blindwerte.

5.2.4 Anaerober Abbautest mit Biogassubstrat (in Anlehnung an DIN EN ISO 117341)

In Anlehnung an die DIN EN ISO 11734 (DIN 1998) wurde der Anaerobtest mit Biogassubstrat etabliert. Dazu waren mehrere Vorversuche notwendig (5.2.4.1). Das Biogassubstrat wurde aus der Biogasanlage in Soderstorf (25 km süd-westlich von Lüneburg) bezogen. Die Biogasanlage besteht aus fünf beheizten und anaerob betriebenen Fermentern. Das Substrat wird zum Großteil den Fermentern 1 & 2 zugeführt, zum kleineren Anteil den Nachfermentern 3 & 4. Fermenter 5 ist das Endlager, aus dem Biogassubstrat wieder dem System rückgeführt wird (Abb. 5-7).

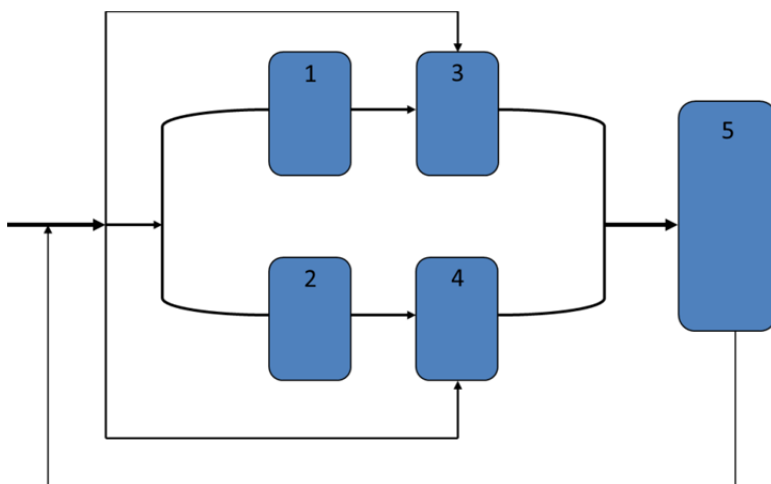


Abb. 5-7: Schematischer Aufbau der Biogasanlage mit den Hauptfermentern 1 & 2, den Nachfermentern 3 & 4 und dem Endlager 5.

Das Biogassubstrat besteht zu ca. 35 % aus Tiergülle (23 % Schweinegülle aus eigenem Betrieb, 10 % Putenmist aus Fremdbetrieben) und zu 65 % aus Maissilage und Roggenkörnern. Von den hofeigenen Schweinen werden nach Auskunft des Betreibers nur die Ferkel mit geringen Mengen an Amoxicillin gefüttert, Sulfonamide kommen nicht zum Einsatz. Die Analyse des Biogassubstrats mit LC-MS/MS ergab keinen Hinweis darauf, dass über den Putenmist größere Mengen an Sulfonamiden eingetragen werden.

5.2.4.1 Etablierung des Tests

Mehrere Vorversuche wurden durchgeführt, um den anaeroben Abbaustest an die Matrix Biogassubstrat (BGS) zu adaptieren und eine für die Kotrollversuche geeignete Referenzsubstanz zu finden. Die Testansätze wurden unter Ausschluss von Sauerstoff in einem anaeroben "Zelt" (COY Laboratory Products, Grass Lake, USA) unter Stickstoff/Wasserstoff-Atmosphäre angesetzt. Folgende Parameter wurden getestet und optimiert:

- Aktivität des Biogassubstrates aus unterschiedlichen Fermentern
 - geeignete Vorbehandlung (Waschen und Sieben des Inokulums)
 - Inkubationszeit (Dauer der Vorzehrung / Erholung)
 - Referenzsubstanzen: Polyethylenglykol 400, Diethylenglykol, Natriumbenzoat, Natriummalat, Anilin, Palmitinsäure, Octanol, Ethylenglykol, Stärke, Glucose, Natriumacetat
 - Testdauer
-
- Die Vorversuche zeigten, dass sich die Aktivität des Inokulums aus den verschiedenen Fermentern kaum voneinander unterscheidet, da sowohl in die Hauptfermenter als auch in die Nachfermenter frisches Substrat eingebracht wird. Das BGS wurde aus Fermenter 3 entnommen, da damit die homogensten Ergebnisse erzielt wurden.
 - Zunächst wurde das BGS vier bzw. elf Tage bei 35 °C inkubiert, damit die Mikroorganismen eingetragenes Substrat vergären konnten. Anschließend wurde das BGS dreimal mit Mineralmedium gewaschen, um kurz vor Testbeginn das im Substrat gebundene CO₂ auszutreiben. Der anorganische Kohlenstoffgehalt (IC) konnte durch die Verlängerung der Vorgärungszeit von vier auf elf Tage zwar halbiert werden, lag mit 14,7 mg/L aber selbst nach drei Waschgängen immer noch über dem Richtwert von 10 mg/L (DIN, 1998). Die mikrobielle Gasproduktion durch den anaeroben Abbau der eingetragenen Feststoffe wie Pflanzenreste führte spätestens nach vier Wochen zu einer Überschreitung des messbaren Druckbereichs, so dass die Versuche nicht auswertbar waren.
 - Das BGS wurde daher zunächst gesiebt, indem das Substrat in ein gröberes Haushaltssieb (Maschenweite ca. 3 mm) gegeben und solange mit sauerstofffreiem Mineralmedium gespült wurde, bis das Eingangsvolumen wieder erreicht war. Danach wurde der Vorgang mit einem feineren Sieb (1 mm Maschenweite) wiederholt. Das Sieben brachte 2 Vorteile mit sich: zum einen konnte der Feststoffanteil (NPOC) von 223 auf 8 mg/L reduziert werden. Danach reichten zwei Waschvorgänge aus, um den IC auf < 10 mg/L zu reduzieren (Tab. 5-8). Die mikrobielle Gasbildung im Blindwert blieb im messbaren Bereich. Zum anderen bewirkte das Sieben eine weitgehende Homogenisierung des Substrats, die eine gleichmäßige Verteilung des BGSs auf die Testgefäße gewährleistete.

Tab. 5-8: Reduktion des anorganischen Kohlenstoffs (IC) im Biogassubstrat (Fermenter 5) abhängig von der Vorbehandlung; rot: Werte liegen außerhalb der Vorgaben der DIN (1998), grün: Werte erfüllen die Vorgaben.

Ansatz	Vorbehandlung		Wasch- schritte	IC in mg/L Waschvorgänge			
	Sieben	Vorzehrung in Tagen		0	1	2	3
1	-	4	3	n. m.	n. m.	n. m.	29,61
2	-	11	3	88,76	88,33	39,46	14,73
3	x	0	3	119,60	15,38	2,35	0,92
4	x	7	3	136,10	18,53	3,48	2,34

n.m.= nicht messbar, da hoher Schwebstoffanteil Filtration unmöglich machte

- Am Beispiel von Natriummalat zeigte sich, dass nach dem Sieben eine Vorinkubation des BGSs von sieben Tagen die lag-Phase verringerte und die Abbaurrate mindestens um einen Faktor von 1,5 gesteigert werden konnte (Tab. 5-9). Allerdings wurde nicht in allen Ansätzen der nach DIN geforderte Abbau der Referenzsubstanz von 60 % erreicht.

Tab. 5-9: Anaerobe Abbaubarkeit von Natriummalat nach 28 Tagen.

Ansatz	Fermen- ter	Inkubation in Tagen	Wasch- schritte	Anaerober Abbau von Natriummalat					Zunahme der Aktivität
				in %					
				Mess. 1	Mess. 2	Mess.3	MW	SA ± %	
3	5	0	3	29	43	32	35	7	1,9
4	5	7	3	72	57	66	65	8	
5	3	0	2	37	39	27	34	6	
6	3	7	2	43	61	52	52	9	

Bei der Suche nach einer geeigneten Referenzsubstanz schieden Polyethylenglykol 400, Natriumbenzoat und Anilin aus, da sie innerhalb von 30 Tagen keinerlei anaerobe Abbaubarkeit aufwiesen. Es wurden daher weitere Substanzen auf ihre Eignung als Referenzsubstanz untersucht und für schwer abbaubare Substanzen und Natriummalat die Testdauer auf 58 Tage erhöht (

- Tab. 5-10). Die Vorbehandlung des BGSs beinhaltetete, wie bei den späteren Sulfonamid-Messungen, folgende Schritte:
1. BGS aus Fermenter 3
 2. Sieben (Haushaltssiebe mit Maschenweite 3 und 1 mm), verlorengangenes Volumen mit Mineralmedium auffüllen
 3. Vorinkubation von sieben Tagen
 4. 2-maliges Waschen mit Minerallösung direkt vor Testansatz, um CO₂-Gehalt in der wässrigen Phase auf weniger als 10 mg/L zu reduzieren.

Tab. 5-10: Anaerobe Abbaubarkeit möglicher Referenzsubstanzen in einer Ausgangskonzentration von 50 mg/L DOC.

Substanz	Anaerober Abbau in %					Laufzeit in Tagen
	Mess. 1	Mess. 2	Mess. 3	MW	SA in %	
Ethylenglykol	11	33	55	33	22	28
Stärke	32	25	75	44	27	28
Natriumacetat	79	55	59	64	13	28
Glucose	75	n. a.	80	78	4	28
Natriummalat	43	51	52	49	5	28
Natriummalat	67	82	67	72	9	56
Palmitinsäure	25	38	36	33	7	56
1-Octanol	36	58	37	44	12	56

n. a. = nicht auswertbar

Palmitinsäure und 1-Octanol wiesen eine lag-Phase von etwa 35 Tagen auf, ihr Abbau lag nach 56 Tagen deutlich unter den nach DIN (1998) geforderten 60 %, so dass beide Substanzen als Referenzsubstanzen ausschieden.

Von den biologisch leicht abbaubaren Substanzen, die über vier Wochen getestet wurden, unterschieden sich bei Ethylenglykol und Stärke die Abbauwerte in den einzelnen Testansätzen stark voneinander (SA > 22 %). Der anaerobe Abbau von Glucose und Natriumacetat begann nach einer lag-Phase von etwa zwei bzw. drei Wochen (Abb. 5-8). Nach ca. vier Wochen wurde bei beiden Substanzen der Übergang in die stationäre Phase erreicht, wobei nur Glucose in allen Ansätzen Abbauwerte von > 60 % erreichte und die Einzelwerte weniger stark voneinander abwichen als bei Natriumacetat. Natriummalat wurde innerhalb der 28 Tage zwar zu geringeren Anteilen (< 52 %) als Natriumacetat abgebaut, schien aber die stationäre Phase noch nicht erreicht zu haben, so dass die Versuchsdauer auf acht Wochen erweitert wurde. Die Verdopplung der Testdauer bewirkte eine um 150 mbar höhere Gasbildung und einen Abbau von Natriummalat > 60 %. Ferner wurde die Annahme bestätigt, dass der Glucoseabbau nach ca. 30 Tagen beendet war, während der Natriummalat-Abbau erst nach 40 Tagen in die stationäre Phase übergang (Abb. 5-8).

Als Referenzsubstanzen wurden Natriummalat und Glucose gewählt und der anaerobe Abbautest mit Biogassubstrat auf 60 Tage ausgeweitet.

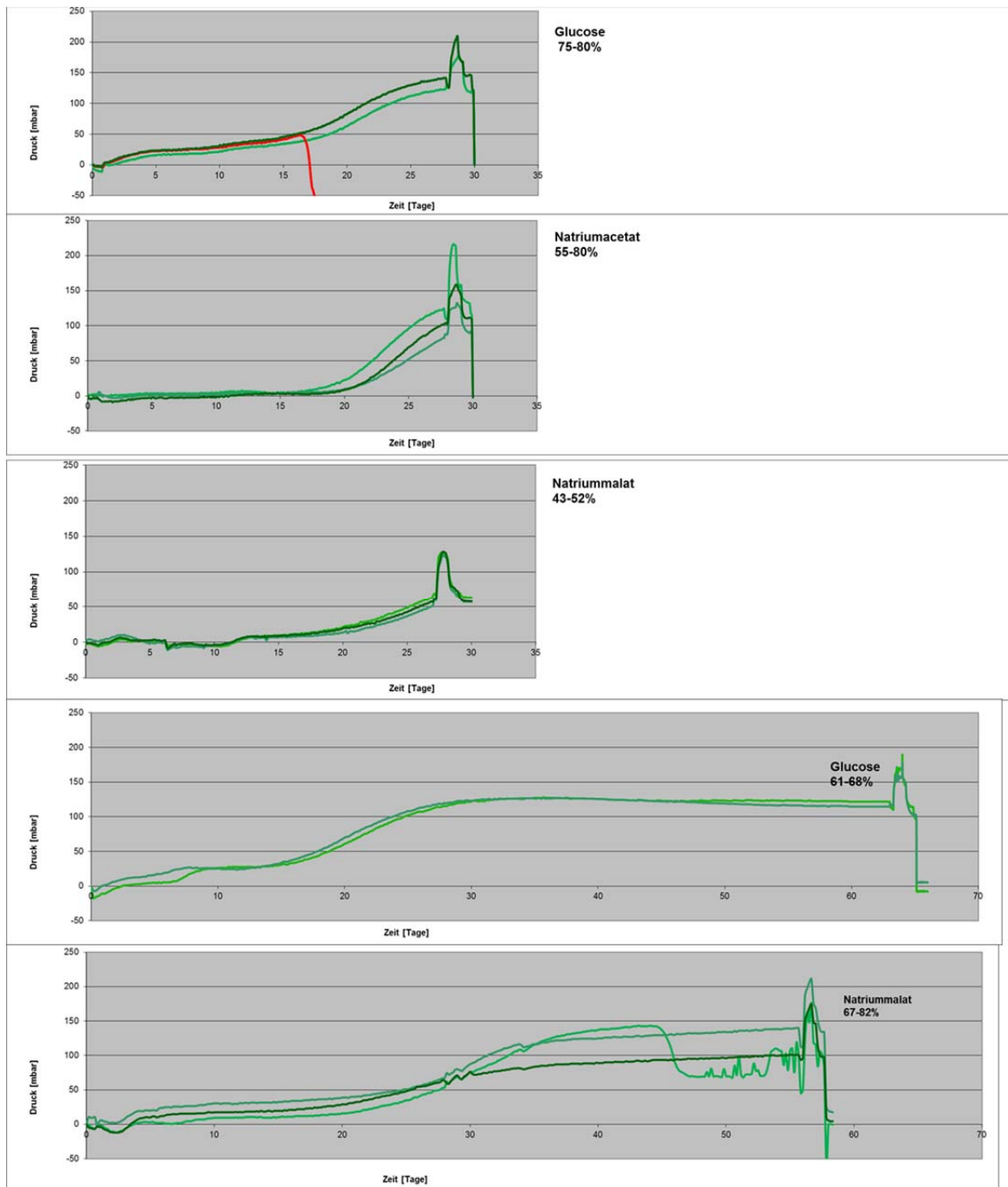


Abb. 5-8: Absolute Druckentwicklung und Abbauwerte von Glucose, Natriumacetat und Natriummalat im anaeroben Abbaustest mit Biogassubstrat.

5.2.4.2 Anaerober Abbau der Sulfonamide mit Biogassubstrat

Die Sulfonamide wurden mit Ausnahme von Sulfaguanidin-Monohydrat mit dem nach 5.2.4.1 vorbehandelten BGS über 58 Tage bei 39 ± 1 °C im Dunkeln inkubiert. Der Testaufbau glich dem Anaerobtest mit Faulschlamm (5.2.3). Die Gasbildung in den geschlossenen Flaschen wurde mit Hilfe von OxiTop®-C Messköpfen (WTW, Weilheim) aufgezeichnet. Als Referenzsubstanzen dienten Glucose und Natriummalat. Es wurden vier Anaerobtests durchgeführt, die in Tab. 5-11 farblich markiert sind.

Tab. 5-11: Anaerobe Abbaubarkeit der Sulfonamide mit Biogassubstrat nach Auswertung des Tests über die Druckentwicklung infolge der Biogasproduktion. Die Ergebnisse stammen aus vier farblich gekennzeichneten Testdurchläufen, die nach DIN validen Ergebnisse sind fett dargestellt. Als Referenzsubstanzen wurden Glucose (G) und Natriummalat (NM) verwendet.

Substanz	Abbau anhand der Druckentwicklung					
	Testansatz		Qualitätskontrolle		Toxizitätskontrolle	
	n	Abbau in %	n	Abbau in %	n	Abbau in %
Sulfamethoxypyridazin	3	-50 bis 0	3 G	50-60	1	52
Sulfadiazin	1	0			1	50
Sulfathiazol	2	-25 bis -15			1	58
Sulfanilamid	3	- 5 bis 0			1	60
Sulfachloropyridazin	3	-30 bis -10			n.a.	n.a.
	3	-30 bis -25	3 NM	40-45%	1	30
	3	10	3 NM	>60 bis >70*	2	> 50 bis 55*
Sulfadimethoxin			3 G	>55 bis >65*	2	>65 bis 90*
	3	0 bis 10	3 NM	>60 bis >70*	2	>45 bis 75*
			3 G	>55 bis >65*	2	>55 bis >60*
Sulfapyridin	3	-20 bis -5	3 NM	40-45%	3	35 bis 45
	3	-5 bis 10	3 NM	40-45%	3	35 bis 85
	2	5 bis 15	3 NM	>60 bis >70*	1	>60*
Sulfadimidin/Sulfamethazin			3 G	>55 bis >65*	2	n.a.
	3	0 bis 10	3 NM	40-45%	3	45 bis 50
	2	-5 bis 25	2 G	60 bis 70	1	n.a.
Sulfamerazin			2 NM	75 bis 95	1	30**
	2	-10 bis 10	2 G	60 bis 70	1	60
Sulfamethoxazol			2 NM	75 bis 95	1	n.a.
	2	25-35	2 G	60 bis 70	1	90
			2 NM	75 bis 95	1	85

n.a. = nicht auswertbar, Ausstieg Messkopf!

* Messwerte entsprechen Druckentwicklung vor Austreibung des gebundenen CO₂ durch Säure, da danach Druck über messbaren Bereich angestiegen ist

** Druckentwicklung entspricht der in Qualitätskontrolle. Durch Druckabfall am 8. Tag beginnt Druckbildung im Negativen und erreicht geringen Endwert

In den Blindwerten aller vier Tests führte der mikrobielle Abbau eingeschleppten Substrats nach vier Wochen zu einem messbaren Druckanstieg. Da die Gasbildung in den Blindwerten von allen Messwerten abzuziehen ist, fiel dadurch der Druck in den Kontroll- und Testansätzen zum Testende hin ab.

In zwei Testdurchläufen (in Tab. 5-11 hellblau und grau gekennzeichnet) war die Aktivität des BGS geringer als in den anderen Tests. Die Referenzsubstanz in den Kontrollansätzen wurde in keinem Ansatz zu mehr als 60 % abgebaut, so dass die Tests nach DIN (1998) nicht valide sind. Im Test mit der Referenzsubstanz Glucose (hellblau) entsprach der in der Gasphase der Kontrollflaschen entstandene Druck kurz vor Austreibung des gelösten CO₂ einem Glucoseabbau von 40 bis 50 %. Nach dem Austreiben des in der wässrigen Phase gebundenen CO₂ stieg der Druck des gesamten Gases und damit die errechnete Abbaurate auf 50 bis 60 % an (Abb. 5-9). Da bereits am Tag 30 in der Gasphase der Qualitätskontrollen die höchsten Drücke gemessen wurden, kann angenommen werden, dass diese einem Glucoseabbau von mehr als 40 bis 50 % entsprachen und nach Ansäuerung höhere Werte als 50 bis 60 % erreicht hätten. Diese Annahme wird durch die Vorversuche bestätigt, in denen nach 30 Tagen ein Glucoseabbau von 75 bis 80 % gemessen wurde (Abb. 5-8). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die mikrobiologische Aktivität des Biogassubstrats den Anforderungen der DIN entsprach. Der Test wurde aus diesem Grunde nicht wiederholt und die Ergebnisse in die Auswertung einbezogen. Demgegenüber wurde der nach DIN ungültige Test mit der Referenzsub-

stanz Natriummalat (grau) wiederholt, da hier Ungewissheit bestand, ob die höchsten, am 40. Tag gemessenen Drücke einem Natriummalat-Abbau von mehr als 60 % entsprochen hätten.

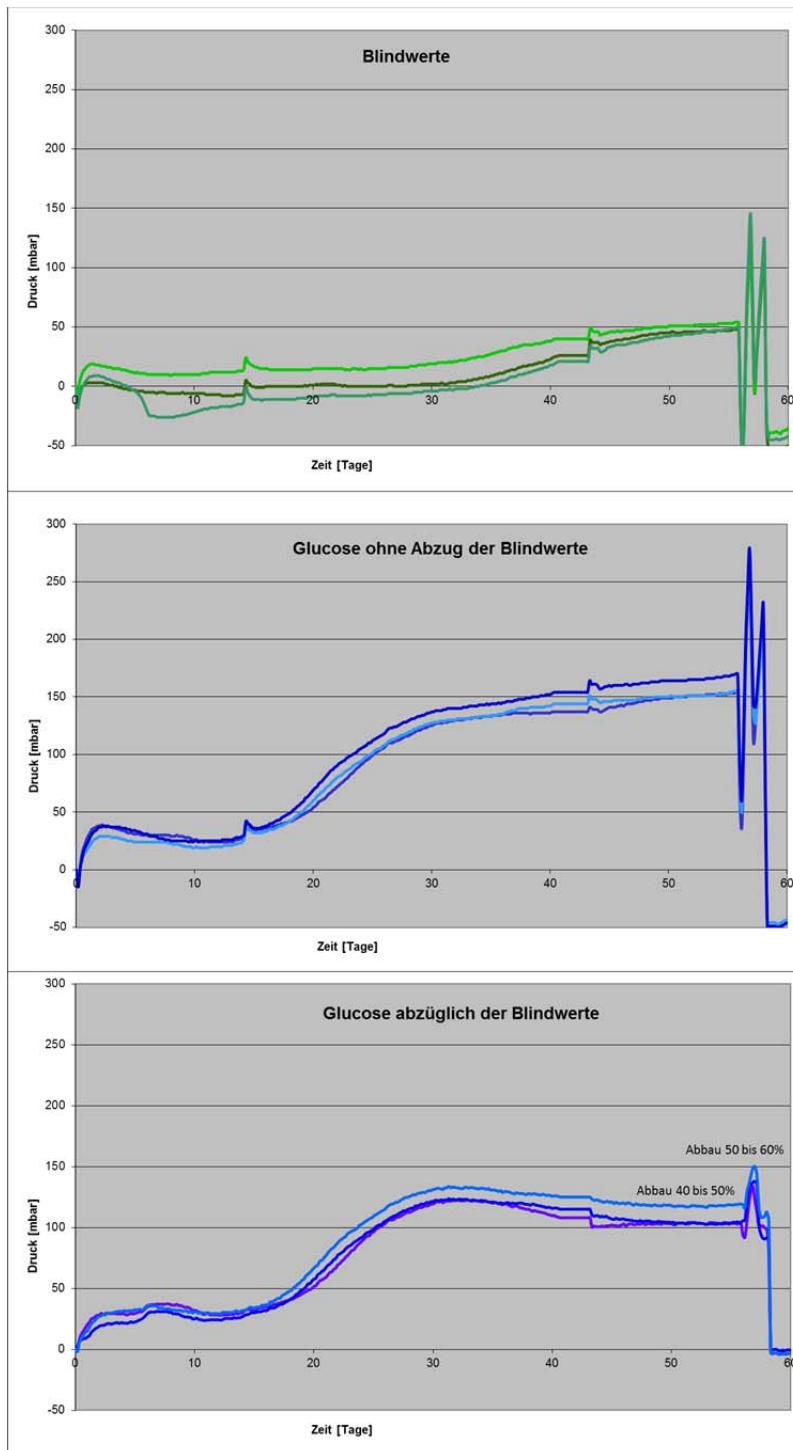


Abb. 5-9: Anaerober Abbautest mit Biogassubstrat: Druckentwicklung in den Blindwerten und Qualitätskontrollen mit der Referenzsubstanz Glucose (50 mg/L OC).

Der Anaerobtest mit BGS wurde zum einen anhand der Gesamtgasproduktion, zum anderen analytisch ausgewertet.

A) Die Gasproduktion wurde im Dreifachansatz gemessen, erwies sich aber über den Zeitraum von acht Wochen als sehr störungsanfällig, so dass nicht immer alle drei Parallelansätze zum Ende

des Tests auswertbar waren. Anhand der Gasbildung wurde Sulfamethoxazol zu 25 bis 35 % anaerob abgebaut (n = 2). Bei allen anderen Sulfonamiden lag der mittlere Abbau unter 10 %, so dass sie als nicht anaerob abbaubar eingestuft wurden. In Abb. 5-10 ist die Druckentwicklung exemplarisch für vier Sulfonamide aufgetragen.

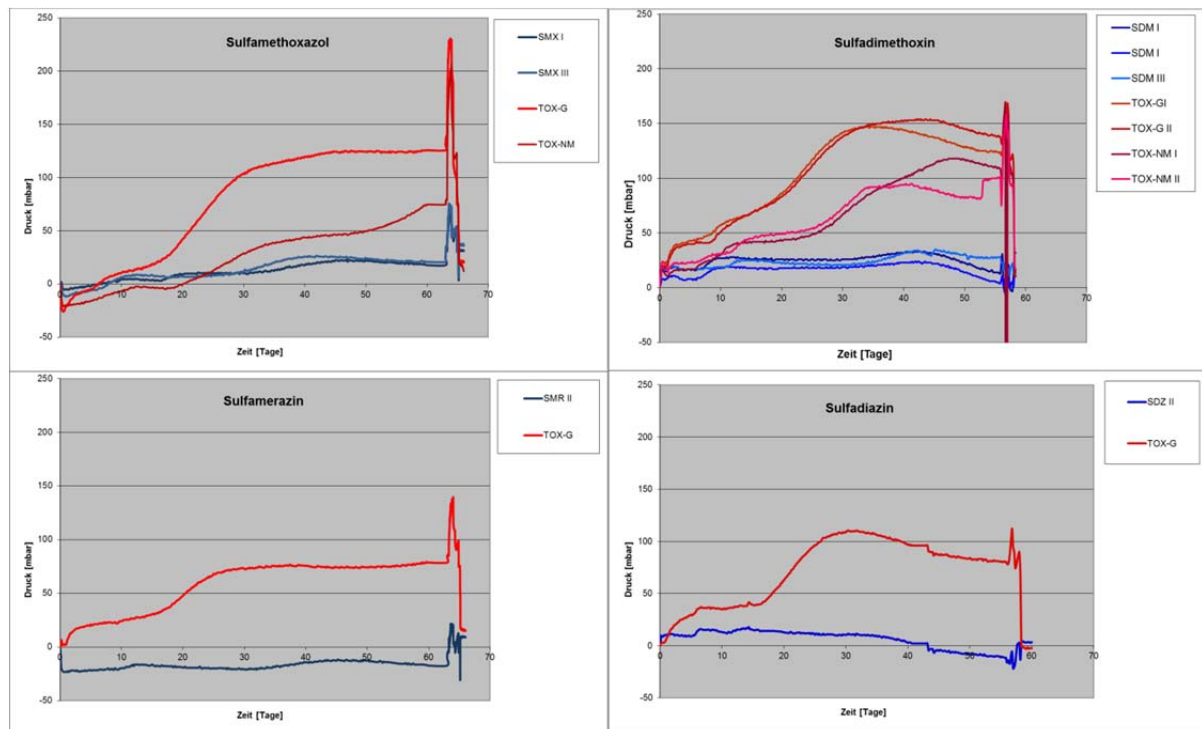


Abb. 5-10: Anaerobe Abbauteests mit Biogassubstrat: Druckverläufe in den Testansätzen (rot) und Toxizitätskontrollen (blau); Konzentration der Sulfonamide und Referenzsubstanzen (G: Glucose, NM: Natriummalat) jeweils 50 mg/L OC.

B) Die analytische Auswertung des Anaerobtests mit BGS zeigte, dass die Sulfonamidkonzentrationen nicht in allen Ansätzen einem organischen Kohlenstoffgehalt von 50 mg/L entsprachen, sondern meist mit Konzentrationen zwischen 30 bis 145 mg/L um diesen Sollwert schwankten. Dies deutet darauf hin, dass die Sulfonamide in den hoch konzentrierten Stammlösungen nicht vollständig gelöst vorlagen.

Während es anhand der Druckmessung nur für Sulfamethoxazol (25-35 %) einen Hinweis auf anaerobe Abbaubarkeit gab, zeigte die HPLC-Analytik neben Sulfamethoxazol auch für Sulfamerazin und Sulfadimethoxin eine Elimination von $44 \pm 8 \%$ (n = 3) bzw. $34 \pm 9 \%$ (n = 6). Für Sulfamethoxazol wurde analytisch mit $84 \pm 8 \%$ (n = 3) die höchste Primärelimination ermittelt (Tab. 5-12). Für alle anderen Sulfonamide wurden anhand der analytischen Messungen mittlere Eliminationsraten unter 15 % berechnet. Mit UV/Vis (270 nm) konnte keine Bildung von Transformationsprodukten beobachtet werden.

Tab. 5-12: Anaerobe Abbaubarkeit der Sulfonamide mit Biogassubstrat: Gegenüberstellung der Testauswertung über die Biogasproduktion (dunkelgrün) und nach analytischer Auswertung des Tests mit HPLC-Analytik und UV-Detektion (hellgrün); NM = Referenzsubstanz Natriummalat, G = Referenzsubstanz Glucose.

Substanz	Abbau anhand Druckentwicklung in %		Abbau anhand Analytik in %					
	n	Testansatz	Testansatz			Toxizitätskontrolle		
			n	MW	STABW	n	MW	STABW
Sulfamethoxyridazin	3	-50 bis 0	3	12,62	3,0	1 G	-89,52	
Sulfadiazin	1	0	1	-7,35	10,6	1 G	-12,80	
Sulfathiazol	2	-25 bis -15	2	-5,00	10,5	1 G	43,40	
Sulfanilamid	3	- 5 bis 0	3	7,50	20,0	1 G	-212,00	
Sulfachloropyridazin	3	-30 bis 10	9	14,85	6,5	5 NM	9,33	10,0
	3					3 G	-4,13	1,2
Sulfadimethoxin	3	0 bis 10	6	34,67	25,3	5 NM	32,31	15,0
						2 G	34,27	1,4
Sulfapyridin	3	5 bis 15	6	-346,34	145,9	5 NM	-135,82	47,5
						2 G	-117,79	24,9
Sulfadimidin/Sulfamethazin	3	-5 bis 25	6	-0,49	14,0	4 NM	-0,49	14,0
						1 G	-114,75	
Sulfamerazin	2	-10 bis 10	3	44,08	8,5	1 NM	67,81	
						1 G	40,29	
Sulfamethoxazol	2	25-35	3	83,64	8,2	1 NM	100,00	
						1 G	93,19	

Bei Sulfamerazin konnte die Bildung eines Transformationsproduktes mit einer verlängerten Retentionszeit (16,6 min zu 13,3 min) und einer spezifischen Masse m/z 547,2 nachgewiesen werden. Die Masse des Transformationsproduktes könnte auf eine Hydrolyse mit anschließender Dimerisierung hinweisen.

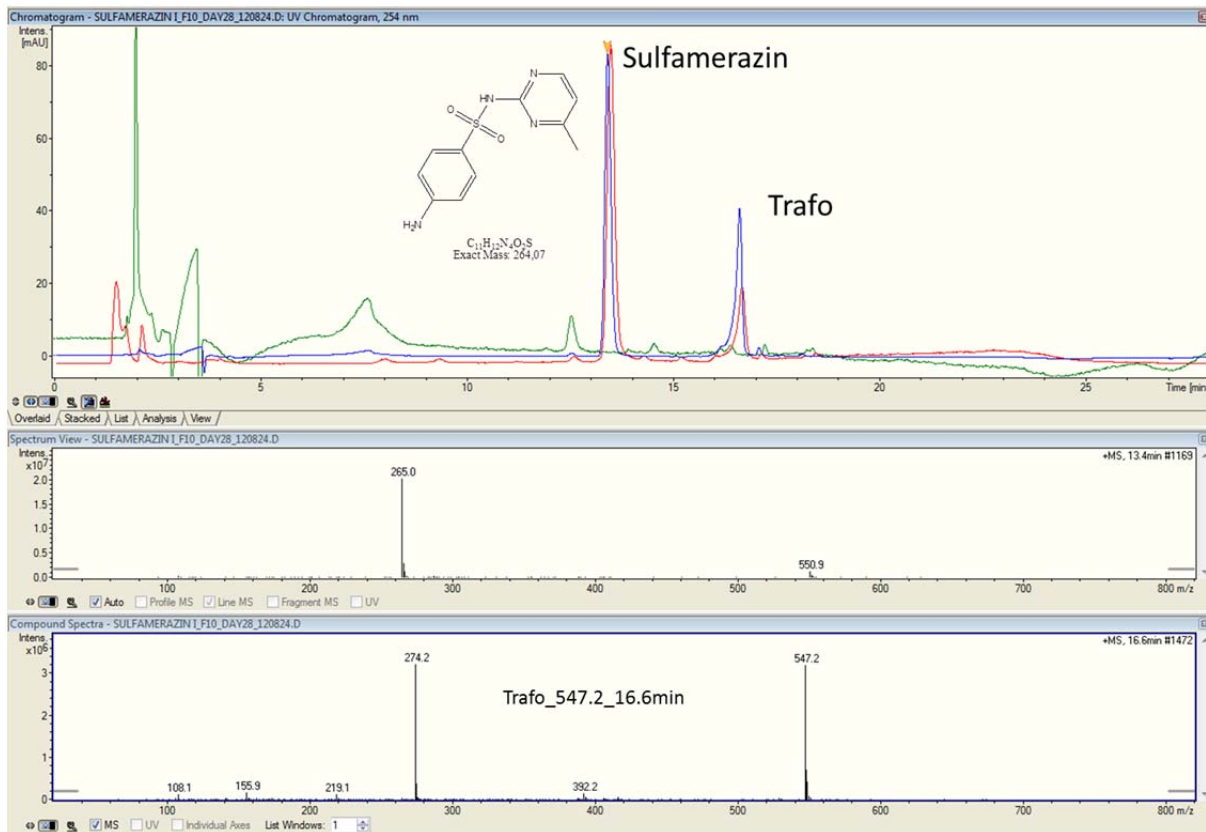


Abb. 5-11: Massenspektrometrische Auswertung des anaeroben Abbaus von Sulfamerazin mit Biogasssubstrat: Gesamtionen-Chromatogramme des Blindwertes (grün) und Testansatzes am Tag 58 (rot) sowie UV-Chromatogramm des Testansatzes am Tag 58 (blau); Trafo: Transformationsprodukt aus unvollständigem Abbau von Sulfamerazin.

Bei Sulfadimethoxin konnte die Bildung von drei verschiedenen Transformationsprodukten nachgewiesen werden, die polarer als die Muttersubstanz waren (Abb. 5-12). Alle wiesen im Positivmodus ein m/z 297 auf, woraus sich die Masse des Neutralmoleküls von m/z 296 herleitet. Dazu passt das Ion mit m/z 319, welches das korrespondierende Natriumaddukt darstellt. Die Differenz von 14 deutet auf die Abspaltung der Methylgruppen an Position 3 und 5 des Pyrimidinringes hin (Abb. 5-13), was zu der höheren Polarität im Vergleich zu der Ursprungssubstanz passen würde. Als Ursache für diese Transformationsprodukte wurde zuerst eine saure Hydrolyse der Methoxygruppen vermutet, da am Ende des Anaerobtests das noch in der wässrigen Phase gebundene CO_2 durch die Zugabe von Säure ausgetrieben wird. Diese Vermutung konnte aber durch Untersuchung von angesäuerten Standardlösungen von Sulfadimethoxin verworfen werden, so dass die Methoxygruppen schon im Verlauf des Testes abgespalten worden sein mussten.

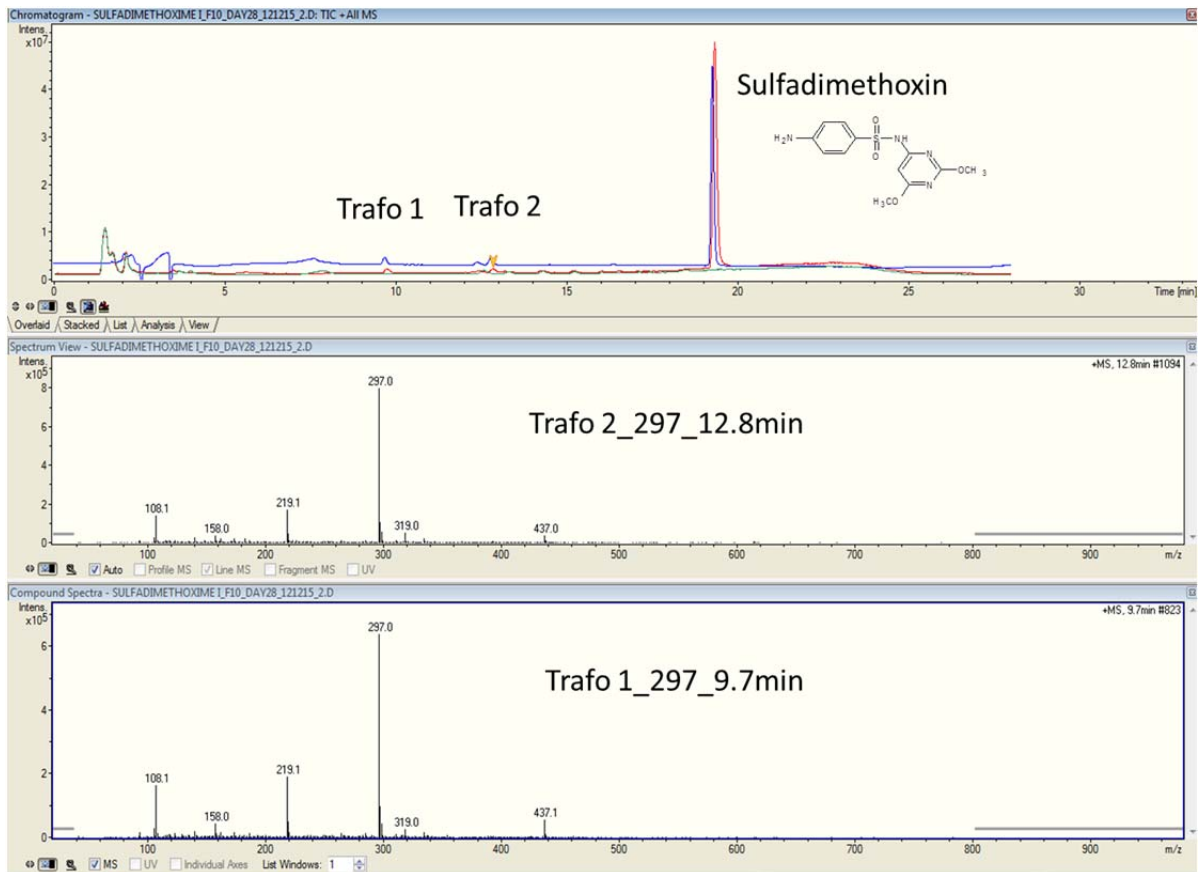


Abb. 5-12: Massenspektrometrische Auswertung des anaeroben Abbaus mit Biogassubstrat von Sulfadimethoxin: Gesamtionen-Chromatogramme des Blindwertes (grün) und Testansatzes am Tag 58 (rot) sowie UV-Chromatogramm des Testansatzes am Tag 58 (blau).

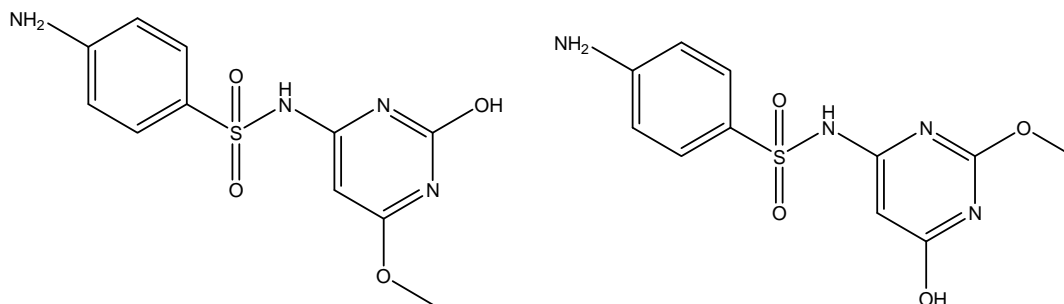


Abb. 5-13: Strukturvorschlag Transformationsprodukt 1 bzw. 2 von Sulfadimethoxin.

Für Sulfamethoxazol konnten nach 58 Tagen sechs Transformationsprodukte nachgewiesen werden, deren mengenmäßige Verteilung in Abb. 5-14 dargestellt ist.

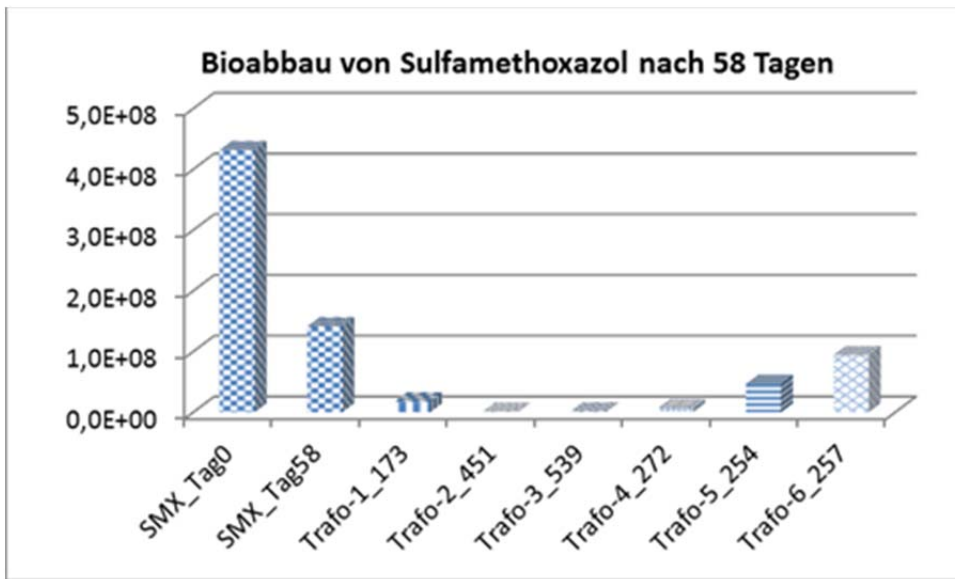


Abb. 5-14: Mengenverteilung von Sulfamethoxazol und seiner Transformationsprodukte anhand der Peakflächen.

Da die Transformationsprodukte kürzere Retentionszeiten aufwiesen, sind sie polarer als Sulfamethoxazol (Abb. 5-15).

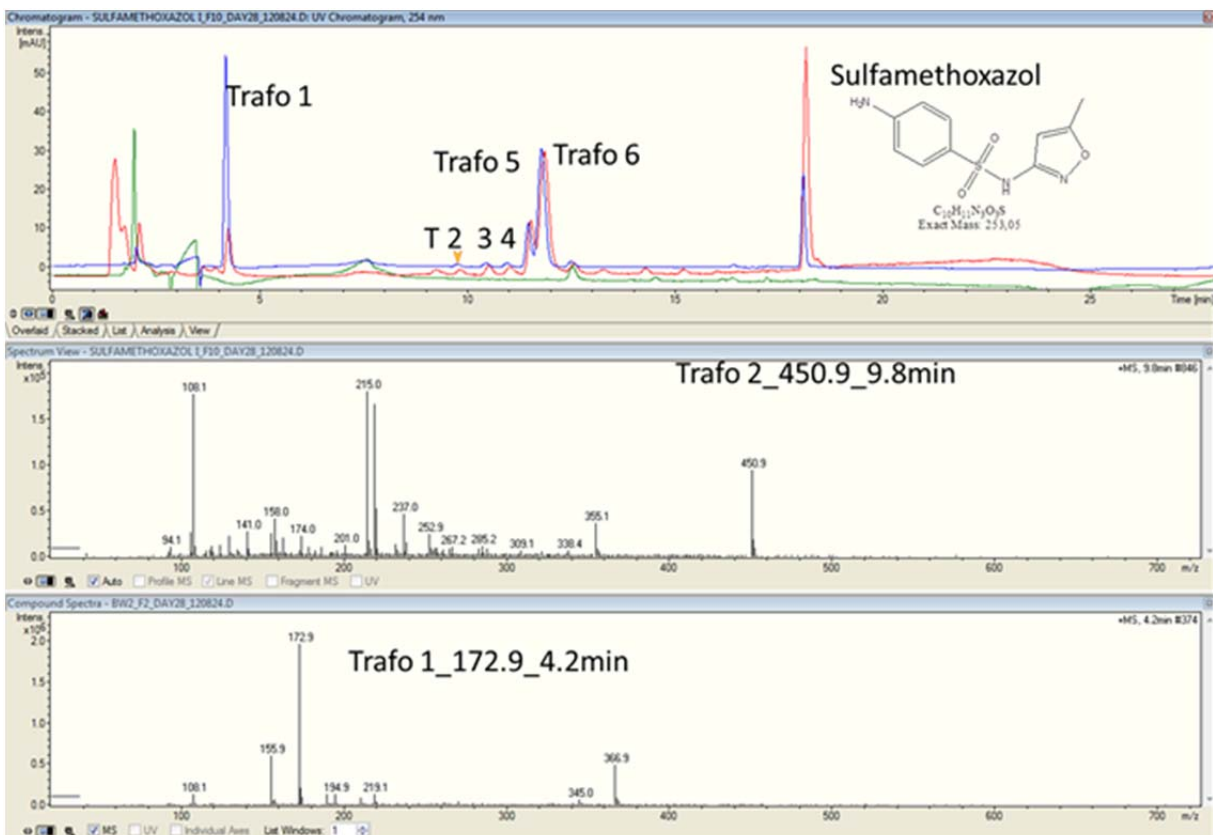


Abb. 5-15: Massenspektrometrische Auswertung des anaeroben Abbaus mit Biogassubstrat von Sulfamethoxazol: Gesamtionen-Chromatogramme des Blindwertes (grün) und Testansatzes am Tag 58 (rot) sowie UV-Chromatogramm des Testansatzes am Tag 58 (blau).

Für das Transformationsprodukt-1 kann das Ion mit m/z 172,9 für das Wasserstoffaddukt angenommen werden. Dazu passt das Ion mit m/z 194,9 als Natriumaddukt und m/z 366,9 als Dimer (Natriumaddukt). Dieses Ion würde für die Abspaltung der 5-Methylisoxazolgruppe stehen (Abb. 5-16). Für die anderen gefundenen Massen konnte kein Strukturvorschlag gemacht werden.

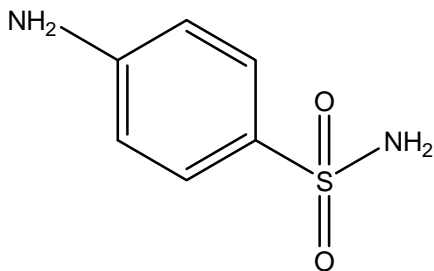


Abb. 5-16: Strukturvorschlag für Transformationsprodukt 1 von Sulfamethoxazol.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aus den anaeroben Abbautests, dass fünf Sulfonamide (Sulfaguanidin-Monohydrat, Sulfathiazol, Sulfamethoxy-pyridazin, Sulfachloropyridazin und Sulfadimethoxin) in einer Konzentration von 50 mg/L OC eine toxische Wirkung auf die Mikroorganismen des Faulschlamm hatten, die in diesem Konzentrationsbereich (für Sulfathiazol sogar in deutlich höherer Konzentration) auf die Mikroorganismen des Biogassubstrats nicht feststellbar war. Im Faulschlamm wurde kein Sulfonamid zu mehr als 15 - 25 % abgebaut. Im Biogassubstrat wurde über die Gasbildung für Sulfamethoxazol der höchste Abbau zu 25 - 35 % ermittelt, während in den aeroben Abbautests kein Abbau festgestellt wurde. Die Primärelimination, die nicht mit einer Gasproduktion einhergehen muss, lag für Sulfamethoxazol mit durchschnittlich 84 % höher und ging mit der Bildung von sechs stärker polaren Transformationsprodukten einher. Für Sulfamerazin wurde eine mittlere Primärelimination von 44 % analysiert. Für Sulfadimethoxin, das im Mittel zu 35 % eliminiert wurde, wird eine mikrobielle Transformation angenommen.

5.3 Photooxidation von Sulfonamiden

Es wurde die Photolyse unter UV-Licht exemplarisch für Sulfathiazol, Sulfanilamid, Sulfamethoxy-pyridazin und Sulfadiazin untersucht. Die Sulfonamide wurden in einer Konzentration von 10 mg/L in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, pH 7,4) gelöst und über 128 Minuten mit einem Quecksilber-Mitteldruckstrahler UV TQ 150 (UV-Consulting Peschl, Mainz) bestrahlt. Das Lampenspektrum reichte von 240 - 580 nm, die Lichtintensität der neuen Lampe betrug durchschnittlich 47 W. Der vom Hersteller angegebene Photonenfluss für neue Lampen ist Tab. 5-13 zu entnehmen. Der aktuelle Photonenfluss wurde mit dem Aktinometer Terbutylazin, einem Herbizid, gemessen und lag auf Terbutylazin bezogen um Faktor 16 unter den Herstellerangaben (Abb. 5-17).

Tab. 5-13: Herstellerangaben zum absoluten Photonenfluss der HG-UV TQ 150.

l / nm	J / 10⁻³ mol h⁻¹	Bemerkungen
238	3	238/240
239	3	als Gesamtwert 8
240	2	angegeben
248	5	
254	30	
265	11	
270	5	
275	2	
280	6	
289	4	
297	9	
302	17	
313	41	
334	5	
366	71	
390	1	
405	10	405/408
406	10	als
407	10	Gesamtwert 39
408	9	angegeben
436	55	
492	1	
546	84	
577	30	577/579
578	30	als Gesamtwert 82
579	22	angegeben

Die Sulfonamidproben wurden bestrahlt und zu verschiedenen Zeitpunkten mit HPLC analysiert.

Sulfanilamid und Sulfathiazol zeigten nach 8 min eine vollständige Primärelimination (Abb. 5-18), die nur bei Sulfathiazol auch mit einer DOC-Elimination von 30 % einherging. Die Primärelimination von Sulfamethoxyipyridazin und Sulfadiazin verlief langsamer, wobei nach 64 min auch diese beiden Sulfonamide analytisch nicht mehr nachweisbar waren (Abb. 5-18).

Im Falle von Sulfathiazol ging die Elimination der Muttersubstanz mit der Bildung von zwei Photoabbauprodukten einher. Eines war weniger polar als Sulfathiazol und konnte ab der 4. Minute detektiert werden. Das andere wies eine höhere Polarität als Sulfathiazol auf und war ab der 8. Minute chromatographisch sichtbar (Abb. 5-19).

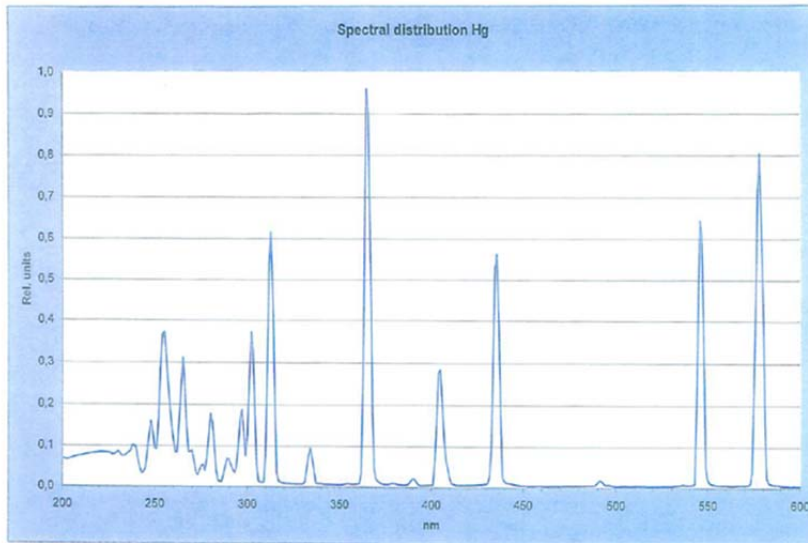


Abb. 5-17: Aktueller Photonenfluss der verwendeten HG-UV TQ 150 (Aktinometer Terbuthylazin).

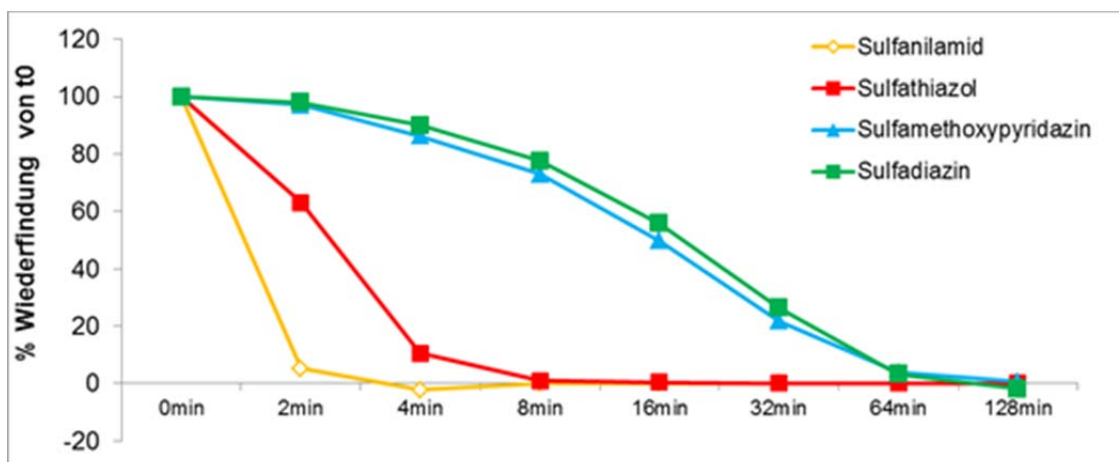


Abb. 5-18: Prozentuale Wiederfindung der Sulfonamide (10 mg/L) nach ihrer UV-Bestrahlung (Hg-UV TQ 150) gemessen mittels HPLC; Injektionsvolumen = 20 µL, isokratische Elution (5.1.2).

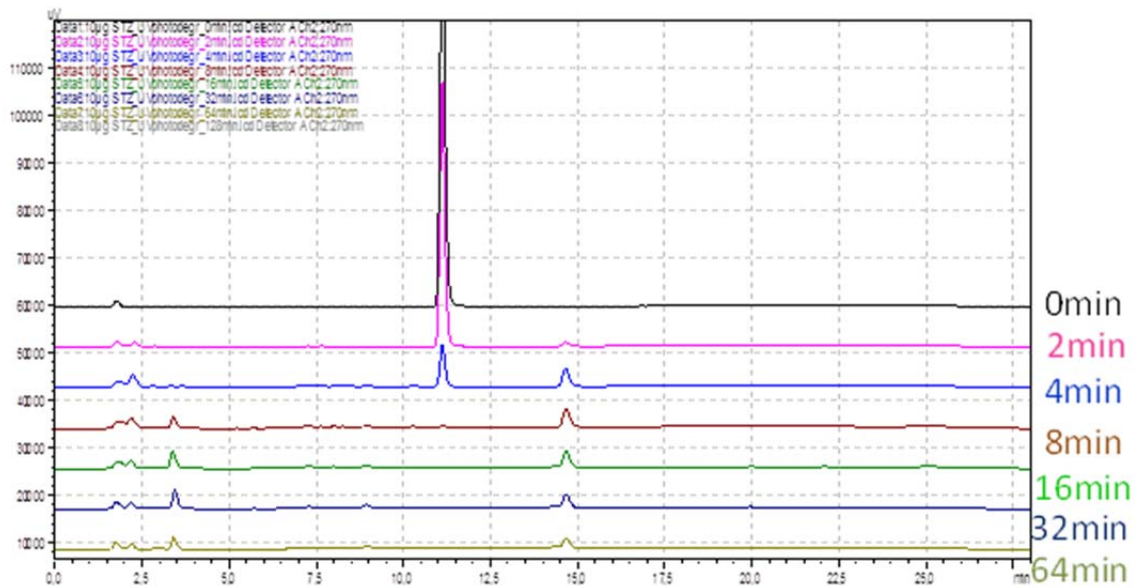


Abb. 5-19: UV-Vis-Chromatogramme von Sulfathiazol nach 0 bis 64 min UV-Bestrahlung.

5.4 Toxizität der Photoabbauprodukte

Die Photolyse der vier ausgewählten Sulfonamide wurde in einer Konzentration von 100 mg/L wiederholt und zeitgleich von TihoPharm und dem Institut für Nachhaltigkeit (Lüneburg) durchgeführt. Ziel war es, die durch die Bestrahlung mit unterschiedlichen UV-Lampen und Versuchsanordnungen entstandenen Photoabbauprodukte hinsichtlich ihrer Toxizität miteinander zu vergleichen. Ein wesentlicher Unterschied beider UV-Lampen ist die Lage ihrer Strahlungsquelle. Bei der HG-UV TQ 150-Lampe (UV-I, Partner Leuphana) taucht diese in die Testsuspension ein, während sie bei UV-II (Partner TihoPharm) über der Testsuspension lokalisiert ist. Für diesen Vergleich wurde in Anlehnung an die Ergebnisse von TihoPharm eine UV-Bestrahlung über 6 Stunden gewählt und die Toxizität sowohl auf eukaryotische (TihoPharm) als auch auf prokaryotische Zellen untersucht.

Die akute und chronische Toxizitätsprüfung gegenüber prokaryotischen Zellen erfolgte in einem modifizierten Leuchtbakterientest (Menz et al. 2013) unter Verwendung des marinen Leuchtbakteriums *Vibrio fischeri* (Stamm: NRRLB-11177). In dem automatisierten Batch-Test werden die Hemmung der Lichtemission und des Wachstums von *Vibrio fischeri* ermittelt. Hierzu wurden die unbestrahlten und bis zu 6 Stunden bestrahlten Sulfonamidproben in zwei Verdünnungen (Verdünnung der Proben im finalen Testansatz: 1:2 und 1:10) mit der Leuchtbakteriensuspension auf einer Mikrotiterplatte vereinigt und über 24 Stunden inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden die optische Dichte und die Lumineszenz gemessen. Die akute Leuchthemmung wurde nach 30 min, die chronische Leuchthemmung nach 24 h erfasst. Nach 14 h wurde die Hemmung der Zellvermehrung bestimmt.

Die Ergebnisse des Wachstumshemmtests zeigen, dass die antimikrobielle Wirkung der Sulfathiazolproben nach UV-Bestrahlung mit UV-I sukzessive zunahm und die nach 6 Stunden entstandenen Photoabbauprodukte eine um ca. 70 Prozentpunkte stärkere Hemmwirkung auf das Wachstum von *Vibrio fischeri* hatten als die Muttersubstanz. Auch bei Sulfanilamid, das bei der getesteten Anfangs-

konzentration von 50 mg/L keine messbare Wachstumshemmung entfaltet, zeigte die Mischung der Photolyseprodukte nach 6 Stunden eine deutlich höhere Toxizität als die unbehandelte Muttersubstanz (55 % Wachstumshemmung nach 360 min Behandlung). Die Hemmwirkung von Sulfamethoxyipyridazin veränderte sich durch die UV-Bestrahlung nicht, während Sulfadiazin seine bakteriostatische Wirkung im getesteten Konzentrationsbereich verlor (Abb. 5-20).

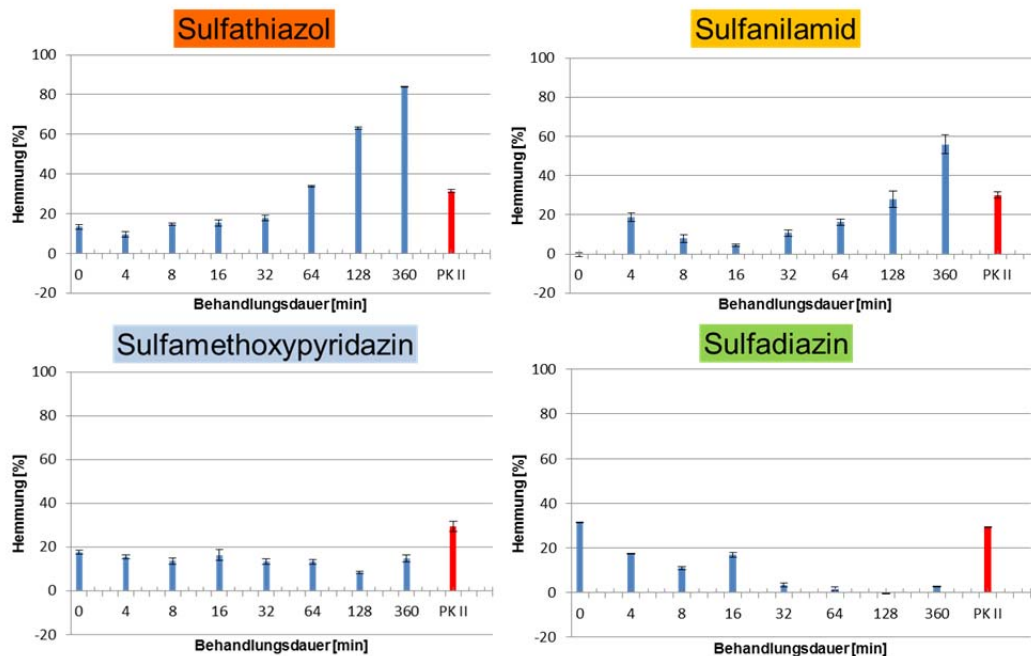


Abb. 5-20: Wachstumshemmung von *Vibrio fischeri* durch die Sulfonamide nach UV-Bestrahlung (UV-I). Ausgangskonzentration: 100 mg/L; 1:2 verdünnt; Dreifachbestimmung. PK II (Positivkontrolle mit 0,05 mg/L Chloramphenicol).

In Abb. 5-21 ist die Hemmung der Zellvermehrung nach 6-stündiger Bestrahlung der Sulfonamide mit den unterschiedlichen UV-Lampen vergleichend dargestellt. Unabhängig von der UV-Quelle bewirkte die Photooxidation von Sulfanilamid eine Steigerung der Wachstumshemmung. Demgegenüber wurden für Sulfathiazol divergierende Ergebnisse erzielt. Während die 6-stündige Bestrahlung mit UV-I zu einem drastischen Toxizitätsanstieg führte, nahm unter UV-II die Toxizität ab. Sulfadiazin verlor bei beiden Photolysen an Toxizität, während die UV-Bestrahlung bei Sulfamethoxyipyridazin ohne Auswirkung auf die bakteriostatische Wirkung blieb.

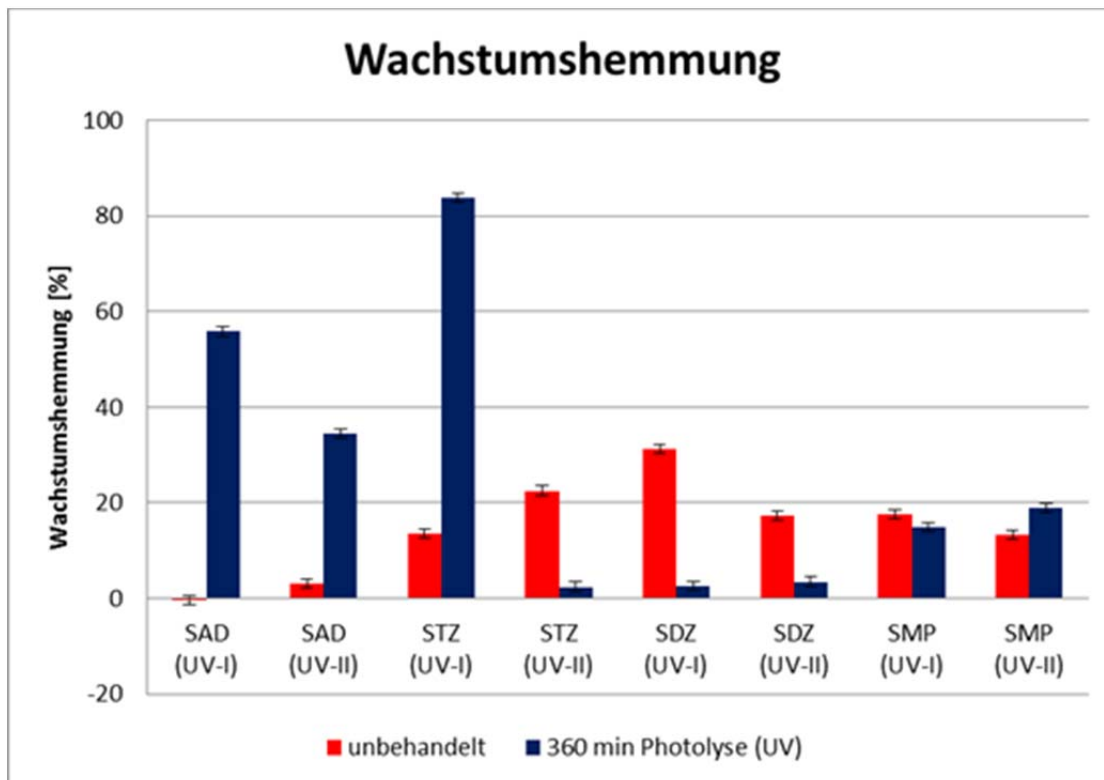


Abb. 5-21: Wachstumshemmung von *Vibrio fischeri* durch die Sulfonamide ohne (rot) und nach 6-stündiger UV-Bestrahlung (blau). SAD (Sulfanilamid), STZ (Sulfathiazol), SDZ (Sulfadiazin), SMPD (Sulfamethoxyypyridazin). UV-Lampen: UV-I (HG-UV TQ 150), UV-II (Tihopharm); Ausgangskonzentration: 100 mg/L; 1:2 verdünnt; n = 3.

Mittels Luminometrie wurde die akute und chronische Leuchthemmung gemessen. Da sich einige Sulfonamidproben unter der UV-I-Bestrahlung verfärbten, werden die absoluten Werte der Leuchthemmung nicht berücksichtigt, da die Eigenfarbe der Proben die gemessene Lumineszenz abschwächen und eine erhöhte Toxizität vortäuschen kann. Im Zuge ihrer Photolyse bewirkten die Sulfonamide eine akute und chronische Leuchthemmung, die in ihren Verläufen aber denen der Wachstumshemmung annähernd glich. Nur bei Sulfamethoxyypyridazin, bei dem die Photolyse keinen messbaren Einfluss auf die Wachstumshemmung hatte, halbierte sich die chronische Leuchthemmung nach 6 Stunden UV-Bestrahlung (Abb. 5-22). Dieser Effekt wurde für beide Verdünnungsstufen (1:2 und 1:10) festgestellt, trat aber nicht bei den Proben auf, die mit der weniger intensiven UV-II-Lampe bestrahlt wurden (Abb. 5-23). Abgesehen von dieser Ausnahme, zeigten die durch UV-I und UV-II nach sechs Stunden Photolyse entstandenen Abbauprodukte im Vergleich zu den Muttersubstanzen den gleichen Trend bei der Leuchthemmung wie bei der Wachstumshemmung (Abb. 5-21).

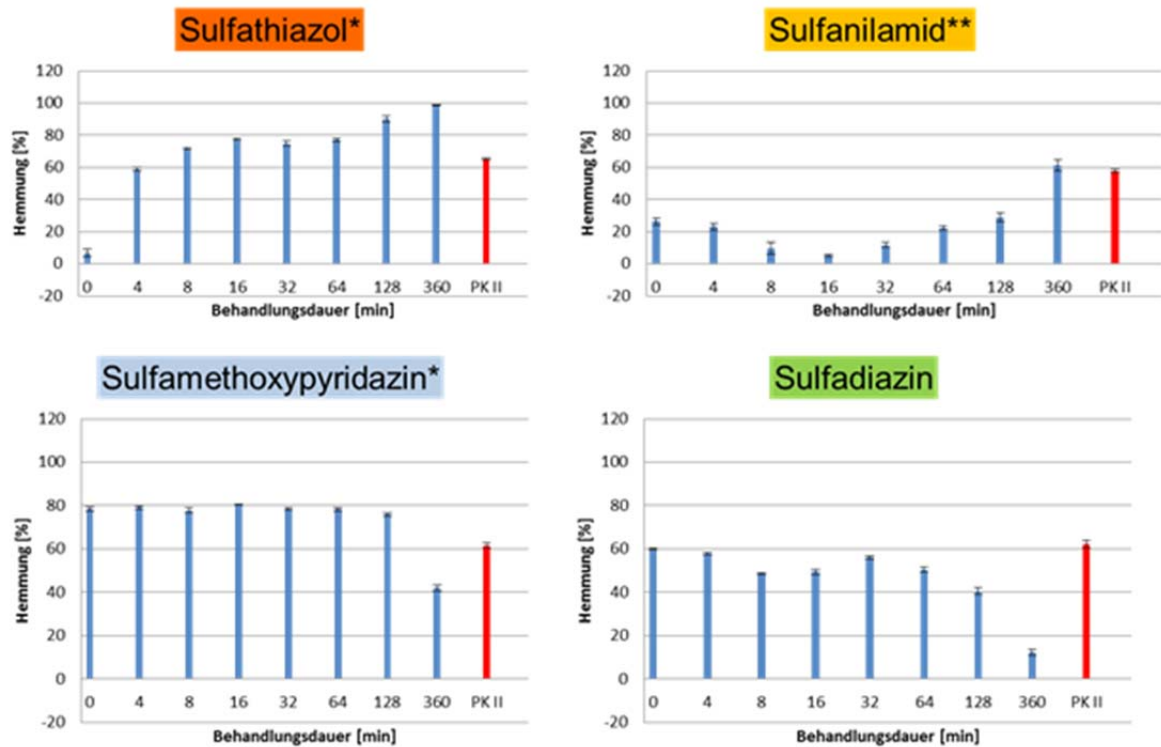


Abb. 5-22: Chronische Leuchthemmung von *Vibrio fischeri* durch die Sulfonamide nach UV-Bestrahlung (HG-UV TQ 150). Ausgangskonzentration: 100 mg/L; 1:2 verdünnt; n = 3. * Verfärbung bzw. ** starke Verfärbung der Proben unter der Photolyse.

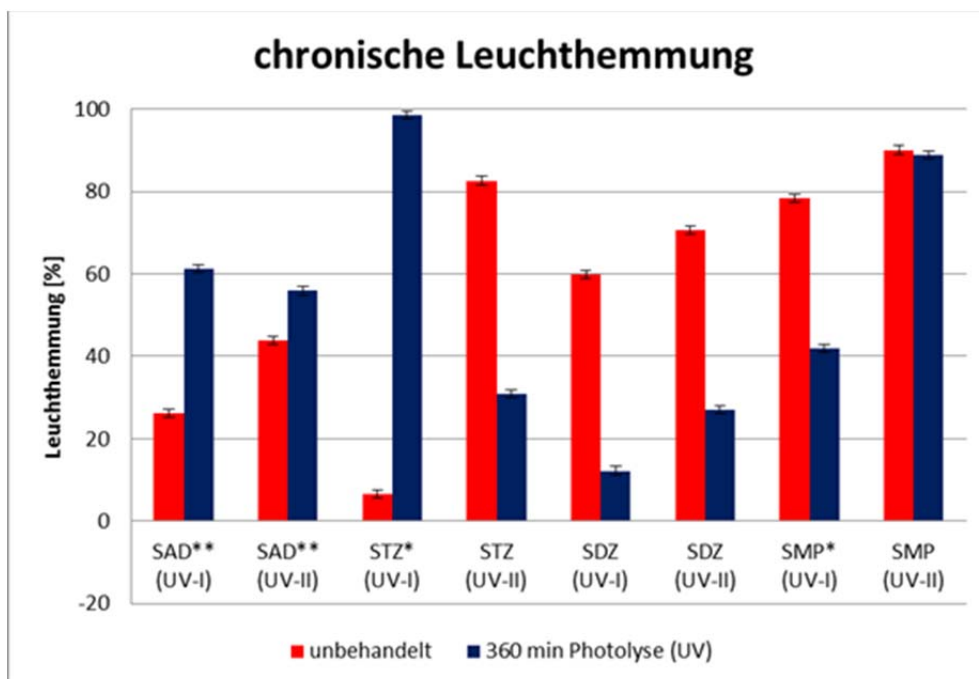


Abb. 5-23: Chronische Leuchthemmung von *Vibrio fischeri* durch die Sulfonamide ohne (rot) und nach 6-stündiger UV-Bestrahlung (blau). SAD (Sulfanilamid), STZ (Sulfathiazol), SDZ (Sulfadiazin), SMPD (Sulfamethoxyypyridazin). UV-Lampen: UV-I (HG-UV TQ 150), UV-II (TihoPharm); Ausgangskonzentration: 100 mg/L; 1:2 verdünnt; n = 3.

Zusammenfassend nahm die Toxizität von Sulfanilamid unabhängig von der Lampe durch die Photolyse zu. Für Sulfathiazol wurden divergierende Ergebnisse erzielt, nämlich eine drastische Toxizitätszunahme durch die Photooxidation mit UV-I bzw. eine Toxizitätsabnahme unter UV-II. Sulfadiazin verlor durch beide Photolysen seine bakteriostatische Wirkung, während Sulfamethoxy-pyridazin nur bei langer und intensiver Bestrahlung (UV-I) eine Abnahme der bakteriostatischen Wirkung erfuhr.

5.5 Ranking

Die Ergebnisse aus den aeroben Abbautests gingen nicht in das Ranking ein, da sich die Sulfonamide bezüglich ihrer aeroben Abbaubarkeit und Toxizität gegenüber dem Inokulum nicht voneinander unterschieden. Im Anaeroben wurde eine Abbaubarkeit kleiner 30 % mit rot, ein Abbau zwischen 30 bis 60 % mit gelb und ein Abbau größer 60 % mit grün bewertet. Der anaerobe Abbau wurde in seiner Gesamtheit rot markiert, wenn kein Abbau stattfand und eine toxische Wirkung auf die Mikroorganismen festgestellt wurde. Bei fehlender Abbaubarkeit wurde nur dann mit gelb bewertet, wenn die Sulfonamide weder auf den Faulschlamm noch auf das Biogassubstrat toxisch wirkten. Wurden toxische Effekte festgestellt, musste der Abbau für eine gelbe Bewertung mindestens 30 % betragen. Grün wurde bei einer Abbaurrate von 30 % und fehlender Toxizität bewertet.

Bei der Photolyse wurde eine Primärelimination kleiner 30 % rot, von 30 bis 70 % gelb und größer 70 % grün bewertet. In der Gesamtbewertung zeigt grün an, dass durch die Photolyse die Toxizität gegenüber Prokaryoten sank und rot, dass die Photoabbauprodukte eine stärkere Toxizität aufwiesen als die Muttersubstanz.

Tab. 5-14: Bewertung der Sulfonamide mit einer 3-stufigen Farbgebung aufgrund der Versuchsergebnisse aus den anaeroben Abbautests und der Photolyse.

Test auf...	SGU	SDZ	SPY	STZ	SMR	SMZ	SMPD	SCY	SMX	SDM	SAD
Anaerobe Abbaubarkeit >60 % (Faulschlamm) in % (n = 3)	n. v.	10 – 20	10 – 20	n. v.	10 – 20	n. u.	n. v.	n. v.	10 – 20	n. v.	15 – 25
Toxizität gegenüber Faulschlamm	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein		Ja	Ja	Nein	Ja	Nein
Anaerobe Abbaubarkeit (Biogassubstrat) in % anhand Gasbildung (n = 1-3)	n. u.	0	5 bis 15	-25 bis -15	-10 bis 10	-5 bis 25	-50 bis 0	-30 bis 10	25 bis 35	0 bis 10	-5 bis 0
Anaerobe Abbaubarkeit (Biogassubstrat) in % anhand Analytik (n = 1-9)	n. u.	-7 ± 11	n. a.	-5 ± 10	44 ± 9	-0,5 ± 14	13 ± 3	15 ± 7	84 ± 8	35 ± 25	8 ± 20
Toxizität gegenüber Biogassubstrat	n. u.	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Anaerober Abbau	n. u.										
% Abbau nach 128 min UV TQ 150 (10 mg/L)	n. u.	100	n. u.	100	n. u.	n. u.	100	n. u.	n. u.	n. u.	100
% Abbau nach 128 min UV TQ 150 (100 mg/L)	n. u.	55	n. u.	100	n. u.	n. u.	55	n. u.	n. u.	n. u.	100
Photoabbau-Produkte: Wirkung Prokaryot. Zellen	n. u.		n. u.		n. u.	n. u.		n. u.	n. u.	n. u.	
Abbau durch UV-Licht											

SGU: Sulfaguandin; SDZ: Sulfadiazin; SPY: Sulfapyridazin; STZ: Sulfathiazol; SMR: Sulfamerazin; SMZ: Sulfamethazin; SMPD: Sulfamethoxy-pyridazin; SCY: Sulfachloropyridazin; SMX: Sulfamethoxazol; SDM: Sulfadimethoxin; SAD: Sulfanilamid; n. a.: nicht auswertbar; n. u.: nicht untersucht; n. v.: nicht valide; grün: positiv zu bewerten, rot: negativ zu bewerten; gelb: Bewertung nicht eindeutig

6 Zusammenfassende Bewertung

In dem zurückliegenden Forschungsprojekt wurde untersucht, ob es möglich ist, umweltfreundliche Tierarzneimittel zu identifizieren und anhand ausgewählter Feld- und Laborstudien zu charakterisieren. Als Substanzklasse wurden Sulfonamide ausgewählt, da diese nach wie vor in beträchtlichen Mengen nicht nur in Deutschland sondern auch im übrigen Europa, den USA und China verwendet werden (Sarmah et al. 2006; Grave et al. 2010). Der regelmäßige Nachweis dieser Substanzklasse in Wirtschaftsdüngern, im Boden und in der aquatischen Umwelt in den vergangenen Jahren legte den Schluss nahe, dass es sich um persistente Substanzen handelt, die auch akkumulieren können (Hamscher und Mohring 2012). Allerdings konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass sich Sulfonamide z. B. in der anaeroben Fermentation oder bezüglich ihrer Verlagerbarkeit in das Grundwasser trotz ähnlicher molekularer Strukturen unterschiedlich verhalten können (Hamscher et al. 2005; Mohring et al. 2009). Darüber hinaus stehen viele Wirkstoffe als Referenzsubstanzen zur Verfügung und es konnten so auch Substanzen mit geringer veterinärmedizinischer Bedeutung in die Testsysteme integriert werden. Hierüber sollten spezifische Strukturelemente identifiziert werden, die möglicherweise für umweltfreundliches Verhalten verantwortlich sein könnten.

In Tab. 6-1 sind die Ergebnisse der Teilprojekte zusammengeführt ergänzt um die Relevanz der einzelnen Substanzen in der Tiermedizin. Hinsichtlich des anaeroben Abbaus wurden die Daten von Mohring et al. (2009) als wichtig erachtet und für die Gesamtbeurteilung hinzugefügt.

Das Datenmaterial in Tab. 6-1 wurde anschließend von den Projektpartnern gemeinsam bewertet und wie folgt weiter zusammengefasst. Wurde in einer der Untersuchungen ein Abbauprodukt identifiziert, so erfolgte eine positive Gesamtbewertung des anaeroben Abbaus. Eine hohe Eliminationsrate ohne Hinweise auf Abbauprodukte wurde als nicht eindeutig bewertbar charakterisiert. Ebenso wurden die Daten aus den UV-Abbau-Studien zusammengeführt. Hinweise auf eine Toxifizierung der Abbauprodukte in einem der durchgeführten In-vitro-Tests führten bereits zu einer negativen Gesamtbewertung des UV-Abbaus. Hieraus ergibt sich dann die Gesamtbewertung (Tab. 6-2).

Tab. 6-1: Zusammenfassung der Bewertungen der Sulfonamide durch die Projektpartner.

Test auf...	SGU	SDZ	SPY	STZ	SMR	SMZ	SMPD	SCY	SMX	SDM	SAD
Relevanz in der Tiermedizin	gering	hoch	gering	gering	gering	hoch	gering	gering	steigend	gering	gering
Grundwassergängigkeit	grün	rot	gelb	grün	rot	rot	gelb	gelb	rot	rot	n. u.
Anaerober Abbau (Mohring et al. 2009)	n. u.	grün	n. u.	rot	rot	rot	gelb	n. u.	gelb	gelb	n. u.
Anaerober Abbau	n. u.	gelb	gelb	rot	grün	rot	rot	rot	grün	gelb	gelb
Abbau durch UV-Licht (Lüneburg)	n. u.	grün	n. u.	rot	n. u.	n. u.	grün	n. u.	n. u.	n. u.	rot
Abbau durch UV-Licht (TiHoPharm)	n. u.	rot	n. u.	rot	rot	rot	gelb	gelb	rot	rot	gelb

SGU: Sulfaguanidin; SDZ: Sulfadiazin; SPY: Sulfapyridazin; STZ: Sulfathiazol; SMR: Sulfamerazin; SMZ: Sulfamethazin; SMPD: Sulfamethoxypropyridazin; SCY: Sulfachloropyridazin; SMX: Sulfamethoxazol; SDM: Sulfadimethoxin; SAD: Sulfanilamid; n. u.: nicht untersucht; grün: positiv zu bewerten, rot: negativ zu bewerten; gelb: Bewertung nicht eindeutig

Tab. 6-2: Abschließende zusammenfassende Bewertung der Sulfonamide.

Test auf...	SGU	SDZ	SPY	STZ	SMR	SMZ	SMPD	SCY	SMX	SDM	SAD
Relevanz in der Tiermedizin	gering	hoch	gering	gering	gering	hoch	gering	gering	steigend	gering	gering
Grundwassergängigkeit											n. u.
Anaerober Abbau	n. u.										
Abbau durch UV-Licht	n. u.		n. u.								

SGU: Sulfaguanidin; SDZ: Sulfadiazin; SPY: Sulfapyridazin; STZ: Sulfathiazol; SMR: Sulfamerazin; SMZ: Sulfamethazin; SMPD: Sulfamethoxypropyridazin; SCY: Sulfachloropyridazin; SMX: Sulfamethoxazol; SDM: Sulfadimethoxin; SAD: Sulfanilamid; n. u.: nicht untersucht; grün: positiv zu bewerten, rot: negativ zu bewerten; gelb: Bewertung nicht eindeutig

Aus den umfangreichen experimentellen Untersuchungen dieses Projektverbundes ist einerseits abzuleiten, dass es „das“ umweltfreundliche Sulfonamid für alle veterinärmedizinischen Anwendungen nicht gibt und wahrscheinlich auch in Zukunft nicht geben wird. Allerdings lassen Ergebnisse aus den Teilprojekten z. T. deutliche Unterschiede der einzelnen Sulfonamide im Umweltverhalten erkennen. Bezüglich der Arzneimittelformulierung können sogar allgemeingültige Aussagen nicht nur zu Sulfonamiden sondern auch für andere Tierarzneimittel abgeleitet werden.

Bezüglich des Grundwassergefährdungspotenzials konnten deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Sulfonamiden festgestellt werden. So gelangen Sulfamethazin und auch Sulfamethoxazol schon nach der ersten Begüllung innerhalb von sechs Monaten in das Sickerwasser, während die übrigen Verbindungen – mit Ausnahme von Sulfaguanidin und Sulfathiazol – erst nachgewiesen werden konnten, als die Messtechnik deutlich empfindlicher wurde. Insofern geht zumindest eine Grundwassergefährdung von den meisten untersuchten Sulfonamiden aus. Diese Ergebnisse sind für den derzeitigen Einsatz von Sulfonamiden in der Veterinärmedizin von hoher Relevanz: während Sulfaguanidin und Sulfathiazol für die Veterinärmedizin nur von sehr geringer Bedeutung sind, stellt Sulfamethazin neben Sulfadiazin das wichtigste Sulfonamid in der Veterinärmedizin dar. Sulfamethoxazol ist das wichtigste humanmedizinische Sulfonamid-Präparat. Es wird mittlerweile aber auch in der Tiermedizin in zunehmendem Umfang zur Behandlung von Mastgeflügel eingesetzt. Die Langzeitstudie in den Lysimetern zeigte aber auch, dass die Gesamtfrachten der verlagerten Sulfonamide gering sind, sie betragen deutlich weniger als 1 % der ausgebrachten Menge. Auch die fünffache Wiederholung des Ausbringens sulfonamidhaltiger Gülle hatte keinen quantitativen Effekt auf die im Sickerwasser bestimmten Sulfonamidkonzentrationen. Es ist daher davon auszugehen, dass Sulfonamide stark im Boden zurückgehalten werden, aber dass noch ein enormes Auswaschungspotenzial besteht. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass im Boden nur eine sehr geringe Metabolisierung der Sulfonamide stattfindet und diese überwiegend als gebundene Rückstände vorliegen (Kreuzig et al. 2003; Kreuzig und Höltge 2005; Rosendahl et al. 2011). Mit vergleichsweise drastischen Extraktionsverfahren gelingt es jedoch, diese Substanzen nahezu quantitativ aus dem Boden zu extrahieren (Rosendahl et al. 2011). Insofern stellt die Ausbringung sulfonamidhaltiger Gülle ein dauerhaftes Kontaminationspotenzial für das Grundwasser dar.

Aquakulturen stellen langfristig eine wichtige Haltungsform für die Versorgung der Weltbevölkerung mit tierischem Eiweiß dar, aber auch eine ökologisch wichtige Alternative zum Fang von Wildfischen. Aquakulturen stellen den am schnellsten wachsenden Bereich der Lebensmittelproduktion dar. Wie bei jeder Form der intensiven Tierhaltung ist aber auch in diesen Systemen der Infektionsdruck hoch

und der Einsatz von Tierarzneimitteln im Falle von Erkrankungen häufig unumgänglich. In Deutschland ist bislang lediglich ein Tierarzneimittel zur Behandlung von Fischbeständen zugelassen. Sulfonamide sind für einen Einsatz in der Aquakultur prinzipiell geeignet, da sie in Form ihrer Natriumsalze wasserlöslich sind. Zumindest in die obersten Wasserschichten kann Sonnenlicht eindringen und ein wichtiges Teilprojekt waren daher Untersuchungen des Einflusses von UV-Licht auf die Abbaubarkeit von Sulfonamiden. Es zeigte sich, dass sich die untersuchten Arzneimittel hinsichtlich ihrer Abbaubarkeit in zwei Gruppen einteilen lassen: Während Sulfanilamid und Sulfathiazol nahezu vollständig transformiert werden, ist bei den übrigen Sulfonamiden nur ein mittel- bis geringgradiger Abbau festzustellen. Um zu demonstrieren, dass es sich tatsächlich um einen Abbau handelt, wurden weiterführende Untersuchungen zur mikrobiologischen Aktivität, zur Zytotoxizität und zur Zellproliferation der entstehenden Abbaulösungen durchgeführt. Darüber hinaus wurde versucht, mittels analytischer Verfahren Transformationsprodukte zu isolieren und strukturell zu charakterisieren. Insbesondere diese sehr aufwändigen Arbeiten werden auch nach Abschluss des Projektes weitergeführt werden. Hinsichtlich Zytotoxizität und Zellproliferation konnten für die Photodegradationsprodukte keine adversen Effekte nachgewiesen werden. Mittels eines modifizierten mikrobiologischen Hemmstofftests konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass durch Photooxidation die antibakterielle Aktivität der Sulfonamide entfernt werden kann. Parallel durchgeführte Toxizitätsstudien an Leuchtbakterien zeigten jedoch nur für Sulfadiazin eine photolytisch bedingte Abnahme der antimikrobiellen Wirkung. Für Sulfanilamid bewirkte die Photooxidation eine Zunahme der Wachstums- und Leuchthemmung, während für Sulfathiazol entgegengesetzte Ergebnisse erzielt wurden. Dies bedeutet, dass die antimikrobielle Aktivität verschiedener Testlösungen im Zuge der UV-Bestrahlung sogar zugenommen hat. Welche Transformationsprodukte diesen Effekt verursachen, konnte innerhalb der Projektlaufzeit nicht geklärt werden. Darüber hinaus bleibt festzuhalten, dass zur Behandlung der Sulfonamidlösungen unterschiedliche UV-Lampen verwendet wurden.

Insofern kann aus diesem Teilprojekt abgeleitet werden, dass es unter dem Einfluss von UV-Licht abbaubare Wirkstoffe aus der Substanzklasse der Sulfonamide für die Aquakultur gibt. Hinsichtlich der Toxizität der Abbauprodukte lieferten die durchgeführten Untersuchungen allerdings keine einheitlichen Ergebnisse. Daher müssen vor einer veterinärmedizinischen Verwendung der im Abbauverhalten günstig bewerteten Substanzen zunächst weitere standardisierte Toxizitätstests durchgeführt werden, im Idealfall auch mit isolierten chemisch reinen Transformationsprodukten. Von entscheidender Bedeutung für den Einsatz in der Praxis sind die therapeutische Wirksamkeit und eine mögliche Rückstandsbildung in Fischen. Diese Untersuchungen müssen dann im Rahmen des Zulassungsverfahrens als Tierarzneimittel erfolgen.

Nicht nur für die Resorption eines Arzneimittels im Organismus sondern auch für einen möglichen Eintrag eines Wirkstoffes in die Umwelt hat seine Formulierung eine wichtige Bedeutung. Häufig werden Tierarzneimittel in Pulverform dem Futter beigemischt. Hierbei ist i. d. R. mit hoher Staubentwicklung zu rechnen und ein Teil des Arzneimittels kann über den Luftweg andere Stallbereiche kontaminieren, von Landwirten und Tierärzten inhaliert oder über die Abluftsysteme des Stalls auch in die Stallumgebung gelangen (Kietzmann et al. 1995; Hamscher et al. 2003). Daher wurden vergleichende In-vivo-Fütterungsstudien zum Einfluss der Tierarzneimittelapplikation über Mehlfutter und pelletiertes Futter durchgeführt. Da es hier um eine prinzipielle Fragestellung ging, wurde als Wirkstoff Sulfadiazin ausgewählt, eines der wichtigsten Sulfonamide für die Veterinärmedizin in Deutschland. Die Ergebnisse dieser praxisnahen Studien zeigen klar, dass die Sulfadiazingehalte in

Sedimentationsstäuben und auch in Aerosolen während der Pelletfütterung deutlich geringer waren als bei der Mehlfütterung. Diese Befunde für Sulfadiazin lassen sich auf alle Sulfonamide und sicherlich auch auf andere Tierarzneimittelgruppen übertragen, da durch die Gabe eines Tierarzneimittels in staubarmer pelletierter Form sein Eintrag in die Stallluft und in die Stallumgebung deutlich minimiert werden kann. Hierdurch wird unmittelbar die gesundheitliche Belastung von Mensch und Tier reduziert. Darüber hinaus kann durch die Reduktion von Arzneimittelverschleppungen in subtherapeutischen Dosen auch die Entstehung von Antibiotikaresistenzen erschwert werden.

In einem weiteren Teilprojekt wurden umfangreiche Untersuchungen zur aeroben und anaeroben Abbaubarkeit der Sulfonamide mit Standardtests bzw. adaptierten Standardverfahren durchgeführt. Tests zur Bestimmung der aeroben Abbaubarkeit mittels Closed Bottle Test (CBT) haben gezeigt, dass alle untersuchten Sulfonamide als nicht leicht biologisch abbaubar einzustufen sind. Eine substanzbegleitende Analytik konnte darüber hinaus keine Hinweise auf einen Primärabbau liefern. Auch der manometrische Respirationstest, in dem im Vergleich zum CBT eine höhere Konzentration an Testsubstanz sowie eine höhere Inokulumdichte eingesetzt werden, erlaubte die Einstufung aller untersuchten Sulfonamide als nicht leicht biologisch abbaubar.

Untersuchungen zum anaeroben Abbau wurden zunächst mit Faulschlamm und dann mit einem Biogassubstrat durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass fünf Sulfonamide (Sulfaguanidin, Sulfathiazol, Sulfamethoxyipyridazin, Sulfachloropyridazin und Sulfadimethoxin) eine toxische Wirkung auf die Mikroorganismen des Faulschlammes hatten, während das Biogassubstrat nicht negativ beeinflusst wurde. Während im Faulschlamm kein Sulfonamid zu mehr als 25 % abgebaut werden konnte, konnte im Biogassubstrat für Sulfamethoxazol ein Abbau bis zu 35 % ermittelt werden. Die Primärelimination lag für Sulfamethoxazol mit 84 % deutlich höher und mittels analytischer Methoden konnten sechs polarere Transformationsprodukte detektiert werden. Eine hohe Primärelimination für Sulfamethoxazol konnte auch in den gealterten Gülleproben sowie in früheren Untersuchungen festgestellt werden. Für Sulfamerazin wurde eine Primärelimination von 44 % analysiert und für Sulfadimethoxin, das zu 35 % eliminiert wurde, wird eine mikrobielle Transformation angenommen. Diese Untersuchungen zeigen, dass die anerobe Fermentation, wie sie z. B. in Biogasanlagen großtechnisch eingesetzt wird, möglicherweise zu einem Abbau einzelner Sulfonamide beitragen kann. Insofern werden Voruntersuchungen bestätigt, allerdings unterscheiden sich die substanzspezifischen Abbau- bzw. Eliminationsraten. Möglicherweise spielt hierbei auch die Zusammensetzung des Biogassubstrates eine entscheidende Rolle, da die hierin vorhandenen Bakterienpopulationen bislang nicht standardisiert werden können. Als eine vorläufige Schlussfolgerung könnte aus diesen und den zurückliegenden Untersuchungen festgehalten werden, dass Sulfadiazin, Sulfamerazin, Sulfamethoxazol und Sulfadimethoxin möglicherweise durch anerobe Fermentation deutlich reduziert werden können. Diese wäre von unmittelbarer Bedeutung für die landwirtschaftliche Praxis. So könnte durch die Vorbehandlung sulfonamidhaltiger Gülle in Biogasanlagen der Wirkstoffgehalt reduziert werden und die als Dünger verwendeten Fermentationsrückstände würden eine verringerte Arzneimittelfracht in die Böden einbringen.

7 Literatur

DIN (1998) DIN EN ISO 11734 - Bestimmung der vollständigen anaeroben biologischen Abbaubarkeit organischer Verbindungen im Faulschlamm.

FRIEDRICH J., LANGIN A., KUMMERER K. (2013) Comparison of an Electrochemical and Luminescence-Based Oxygen Measuring System for Use in the Biodegradability Testing According to Closed Bottle Test (OECD 301D). *Clean-Soil Air Water* 41(3): 251-257.

FRIMMEL F.H., NIESSNER R. (2010) *Nanoparticles in the Water Cycle: Properties, Analysis and Environmental Relevance*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

GRAVE K., TORREN-EDO J., MACKAY D. (2010) Comparison of the sales of veterinary antibacterial agents between 10 European countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65(9): 2037-2040.

HAMSCHER G., MOHRING S.A.I. (2012) Veterinary Drugs in Soil and in the Aquatic Environment. *Chemie Ingenieur Technik* 84(7): 1052-1061.

HAMSCHER G., PAWELZICK H.T., HÖPER H., NAU H. (2005) Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(4): 861-868.

HAMSCHER G., PAWELZICK H.T., SCZESNY S., NAU H., HARTUNG J. (2003) Antibiotics in dust originating from a pig-fattening farm: A new source of health hazard for farmers? *Environmental Health Perspectives* 111(13): 1590-1594.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. 1996. ICH topic Q2B note for guidance on validation of analytical procedures: methodology GPMP/ICH/281/95.

ISO 5414 (1990) Water Quality - Determination of dissolved oxygen. IN: German Standard Methods for the Examination of Water, Wastewater and Sludge. Weinheim, Basel, Cambridge: VCH Verlagsgesellschaft.

KHALEEL N.D.H., MAHMOUD W.M.M., HADAD G.M., ABDEL-SALAM R.A., KUMMERER K. (2013) Photolysis of sulfamethoxypyridazine in various aqueous media: Aerobic biodegradation and identification of photoproducts by LC-UV-MS/MS. *Journal of Hazardous Materials* 244: 654-661.

KIETZMANN M., MARKUS W., CHAVEZ J., BOLLWAHN W. (1995) Drug residues in untreated swine. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 102(11): 441-442.

KREUZIG R., HÖLTGE S. (2005) Investigations on the fate of sulfadiazine in manured soil: Laboratory experiments and test plot studies. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(4): 771-776.

KREUZIG R., KULLMER C., MATTHIES B., HOLTGE S., DIECKMANN H. (2003) Fate and behaviour of pharmaceutical residues in soils. *Fresenius Environmental Bulletin* 12(6): 550-558.

MAHMOUD W.M.M., KHALEEL N.D.H., GHADA M.H., ABDEL-SALAM R.A., HAIB A., KUMMERER K. (2013) A HPLC-UV method for the simultaneous determination of eleven sulfonamides and its application for fast screening of their aerobic elimination and biodegradation in a simple test. *Clean - Soil, Air, Water* accepted.

MENZ J., SCHNEIDER M., KUMMERER K. (2013) Toxicity testing with luminescent bacteria - characterization of an automated method for the combined assessment of acute and chronic effects. *Chemosphere* accepted.

MOHRING S.A.I., STRZYSCH I., FERNANDES M.R., KIFFMEYER T.K., TUERK J., HAMSCHER G. (2009) Degradation and Elimination of Various Sulfonamides during Anaerobic Fermentation: A Promising Step on the Way to Sustainable Pharmacy? *Environmental Science & Technology* 43(7): 2569-2574.

OECD (1992) Guidelines for Testing of Chemicals: 301 D: Closed Bottle test, 301 F: Manometric Respiratory Test, Organisation of Economic Cooperation and Development, Paris.

ROSENDAHL I., SIEMENS J., GROENEWEG J., LINZBACH E., LAABS V., HERRMANN C., VEREECKEN H., AMELUNG W. (2011) Dissipation and Sequestration of the Veterinary Antibiotic Sulfadiazine and Its Metabolites under Field Conditions. *Environmental Science & Technology* 45(12): 5216-5222.

SARMAH A.K., MEYER M.T., BOXALL A.B.A. (2006) A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65(5): 725-759.

TIEDE K., HASSELLOV M., BREITBARTH E., CHAUDHRY Q., BOXALL A.B.A. (2009) Considerations for environmental fate and ecotoxicity testing to support environmental risk assessments for engineered nanoparticles. *Journal of Chromatography A* 1216(3): 503-509.

8 Öffentlichkeitsarbeit

8.1 Publikationen

Hamscher G, Mohring S, Höper H (2011). Lysimeter-Studien zur Untersuchung des Grundwasser-gefährdungspotenzials von Sulfonamiden. *Lebensmittelchemie* 65 (6/2011), S.150.

Mahmoud WMM, Khaleel NDH, Hadad GM, Abdel-Salam RA, Haiß A, Kümmerer K (2013). Simultaneous Determination of 11 Sulfonamides by HPLC–UV and Application for Fast Screening of Their Aerobic Elimination and Biodegradation in a Simple Test. *Clean – Soil, Air, Water* 41(9), S. 907-916.

8.2 Vorträge/Poster

Stahl J, Zessel K, Kietzmann M (2012) Potential ways to decrease the entry of sulfonamides from swine livestock into the environment, 12th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, EAVPT 2012, 8.-12. Juli, Noordwijkerhout, Niederlande, S. 144.

Zessel K, Stahl J, Kietzmann M (2012) Degradation of sulfonamides after UV-irradiation and biocompatibility of degrading products, 3rd International Conference on Sustainable Pharmacy, Osnabrück, 19.-20. November.

Zessel K, Stahl J, Kietzmann M (2012) Potential Ways To Decrease Environmental Contaminations Of Sulfonamides From Swine Livestock, 3rd International Conference on Sustainable Pharmacy, Osnabrück, 19.-20. November.

Zessel K, Kietzmann M, Mohring S, Hamscher G, Stahl J, UV-Irradiation as potential tool to reduce environmental pollutions of sulfonamides arising from swine livestock, XVIth International Congress on Animal Hygiene-ISAH 2013 Proceedings; 5.-9. Mai, Nanjing, China, S. 642-644.

Stahl J, Zessel K, Hartung J, Schulz J, Kietzmann M, Ways to decrease environmental contaminations of antimicrobials from swine livestock, XVIth International Congress on Animal Hygiene-ISAH 2013 Proceedings; 5.-9. Mai, Nanjing, China, S. 99-101.

Mohring S, Böting K, Höper H, Hamscher G (2012) A promising approach to identify groundwater friendly sulfonamides, 3rd International Conference on Sustainable Pharmacy, Osnabrück, 19.-20. November.

Hamscher G (2012) Replacement of veterinary drugs – possibilities and pitfalls, 3rd International Conference on Sustainable Pharmacy, Osnabrück, 19.-20. November.

Kietzmann M (2012) Potential ways to decrease environmental contaminations of sulfonamides from swine livestock, 3rd International Conference on Sustainable Pharmacy, Osnabrück, 19.-20. November.

Mohring SAI, Höper H, Hamscher G (2013) Identifizierung von "grundwasserfreundlichen" Sulfonamiden – Eine Lysimeter-Studie 42. Deutscher Lebensmittelchemikertag; Braunschweig, 16.-18. September.

Logunova E, Haiß A, Kümmerer K (2012) Investigation of the aerobic and anaerobic biodegradability of sulfonamides, 3rd International Conference on Sustainable Pharmacy, Osnabrück, 19.-20. November.

8.3 Rundfunk

Der Deutschlandfunk berichtete in einem Feature zur nachhaltigen Pharmazie über das Projekt. Projektbezogene Interviews wurden mit Herrn Hamscher, Herrn Kietzmann und Herrn Kümmerer aufgezeichnet. Link: <http://www.dradio.de/dlf/sendungen/forschak/2259359/> (letzter Aufruf am 28.10.2013).