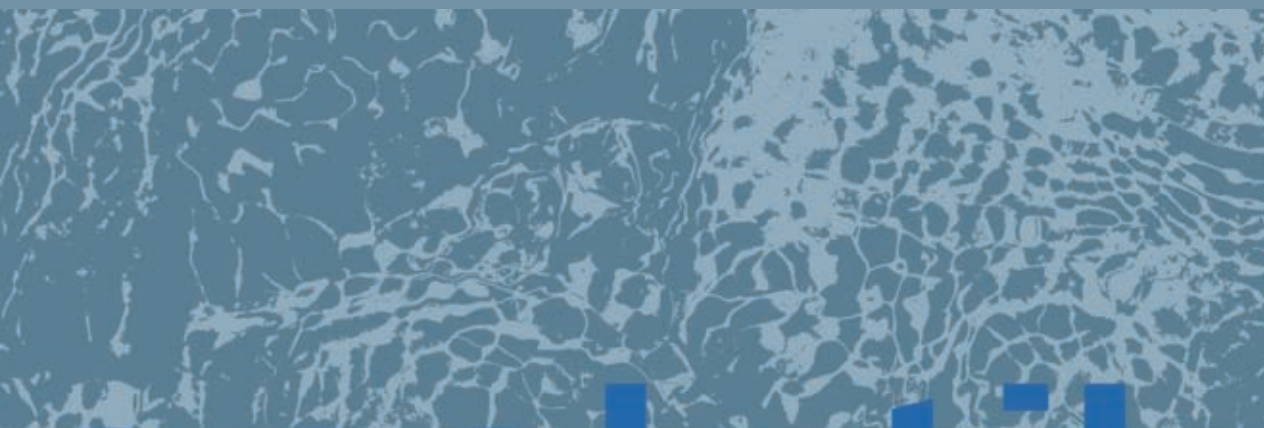




# Projekt „Arzneimittelwirkstoffe und deren Metaboliten:

## Belastungen des Wasserkreislaufs und Möglichkeiten der Verminderung“

Schlussbericht Januar 2010



analytik

## Impressum

Projekt „Arzneimittelwirkstoffe und deren Metabliten: Belastungen des Wasserkreislaufs und Möglichkeiten der Verminderung“,  
Schlussbericht Januar 2010

### Herausgeber:

Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU)

Bürgermeister-Ulrich-Straße 160

86179 Augsburg

Tel.: (08 21) 90 71-0

Fax: (08 21) 90 71-55 56

E-Mail: [poststelle@lfu.bayern.de](mailto:poststelle@lfu.bayern.de)

Internet: [www.lfu.bayern.de](http://www.lfu.bayern.de)

### Bearbeitung/Text/Konzept:

LfU, Referat 75, Dr. Sengl; Referat 76, Dr. Letzel, Dr. Weiß; Referat 77, Dr. Lemmer, Dr. Müller

### Redaktion:

LfU, Referat 75, Dr. Sengl; Referat 76, Dr. Letzel, Dr. Weiß; Referat 77, Dr. Lemmer, Dr. Müller

### Bildnachweis:

Bayerisches Landesamt für Umwelt

### Stand:

Januar 2010

Diese Druckschrift wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden. Sofern in dieser Druckschrift auf Internetangebote Dritter hingewiesen wird, sind wir für deren Inhalte nicht verantwortlich.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung</b>	<b>12</b>
1.1	Konzept und Projektziele	12
1.2	Projektverlauf und Projektbeteiligte	12
<b>2</b>	<b>Stoffauswahl und Analytik</b>	<b>14</b>
2.1	Arzneimittelwirkstoffe und deren Metaboliten	14
2.2	Analytik	16
2.3	Störungen bei der Analytik von Oxipurinol	19
<b>3</b>	<b>Ökochemisches Verhalten</b>	<b>22</b>
3.1	Stoffdaten der ausgewählten Substanzen	22
3.1.1	Carbamazepin	22
3.1.2	Sulfamethoxazol	24
3.1.3	Primidon	27
3.1.4	Ritalinsäure	29
3.2	Ökochemisches Verhalten der ausgewählten Substanzen	30
3.2.1	Abbauverhalten und Eintrag ins Gewässer	30
3.2.2	Verbleib und Ökotoxizität im Oberflächengewässer	40
3.2.3	Stofftransport in Uferfiltrat und Grundwasser	42
3.2.3.1	Säulenversuche	43
3.2.3.2	Uferfiltrat / Grundwasser	51
3.3	Bewertung	59
<b>4</b>	<b>Mikrobiologische und molekularbiologische Untersuchungen zum Abbau von Sulfamethoxazol</b>	<b>62</b>
4.1	Einleitung	62
4.2	Material und Methoden	63
4.2.1	Beprobung von Kläranlagen	63
4.2.2	Batch-Versuche	63
4.2.3	Chemische Analytik	64
4.2.3.1	DOC-Messungen	64
4.2.3.2	Sulfamethoxazol (SMX), N-Acetyl-Sulfamethoxazol (Ac-SMX) sowie die Metaboliten 3-Amino-5-methyl-isoxazol, 3-Amino-isoxazol und Isoxazol	64

4.2.3.3	Acetatmessungen	65
4.2.4	Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden	65
4.2.4.1	Kultivierungstechnik und Charakterisierung der gewonnenen Isolate	65
4.2.4.2	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	65
4.2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	66
4.2.5	SMX-Abbauversuche mit Reinkulturen	69
4.3	Ergebnisse und Diskussion	70
4.3.1	Sulfamethoxazol-Screening	70
4.3.2	SMX-Abbaupotential von Abwasserbiozönosen (Batch-Versuche)	72
4.3.3	Charakterisierung von SMX abbauenden Mikroorganismen (Belebtschlamm-schlämme aus den Batch-Versuchen)	74
4.3.3.1	Identifizierung von Reinkulturen aus SMX abbauenden Biozönosen der Batch-Versuche	75
4.3.3.2	Zusammensetzung und Diversität der Batch-Schlämme	78
4.3.4	SMX-Abbaupotential von Reinkulturen	84
4.3.5	Nachweis von Sulfonamid-Resistenzgenen	86
4.4	Schlussfolgerungen und Ausblick	87
<b>5</b>	<b>Literatur</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>101</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	LC-MS/MS-Beispielchromatogramme für ausgewählte Arzneimittelwirkstoffe	17
Abb. 2:	Vorschlag für die Fragmentierung von Oxipurinol und Xanthin	19
Abb. 3:	Trennung von Oxipurinol und Xanthin	20
Abb. 4:	Humaner Metabolismus von Carbamazepin	22
Abb. 5:	Humaner Hauptmetabolismus von Sulfamethoxazol (SMX)	25
Abb. 6:	Humaner Metabolismus von Primidon (5-Ethyl-5-phenylhexahydropyrimidin-4,6-dion, CAS: 125-33-7)	28
Abb. 7:	Humaner Metabolismus von Ritalin (Methylphenidat, CAS: 113-45-1)	29
Abb. 8:	Primidon- (links oben), PEMA- (rechts oben), Ac-SMX- (Mitte links), SMX- (Mitte rechts) und Oxipurinol-Konzentration bei verschiedenen pH-Werten vor und nach fünftägiger Inkubation bei 50 °C im Thermoschüttler	31

Abb. 9: Mittelwerte der BSB-Ganglinien im geschlossenen Respirometer (Prüfsubstanzen (je n=4): 50 mg/l Primidon (links oben), 50 mg/l PEMA (rechts oben); 100 mg/l SMX (links unten) und 50 mg/l Ac-SMX (rechts unten); Referenzen (n=2) jeweils 100 mg/l Natriumbenzoat; alle Ansätze: 0,03 g/l Belebtschlamm)	33
Abb. 10: Ganglinien der DOC-Elimination im Zahn-Wellentest (Prüfsubstanz 100 mg/l Primidon (oben links) bzw. mg/l PEMA (oben rechts) bzw. 100 mg/l Oxipurinol (Mitte); 100 mg/l SMX (unten links), 50 mg/l Ac-SMX (unten rechts); Referenz jeweils 112 mg/l Diethylenglykol, jeweils 0,2 g/l Belebtschlamm, nur abiotische Kontrollen: Prüfansätze ohne Belebtschlamm)	34
Abb. 11: Massenspektrum der Reaktionslösung von SMX im Zahn-Wellentest, welche den zu identifizierenden Metaboliten enthält (positiver Messmodus)	35
Abb. 12: Ganglinien der Elimination der Arzneimittel-/Metaboliten in Laborkläranlagen (Dosierung 1 µg/l; Mittelwert und einfache Standardabweichung von zwei bis vier Prüfanlagen)	36
Abb. 13: Mediane (n=5) der Konzentrationen der Arzneimittel-/Metaboliten im Verlauf einer 30.000 EW-Kläranlage. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Messwerte wieder	39
Abb. 14: Konzentrations-Zeit-Diagramm von SMX (oben links), Ac-SMX (oben rechts) und Glu-SMX (unten) im Wasser-Sedimenttest ( $c_0$ jeweils 40 µg/l; Sediment und Oberflächenwasser aus einem Altarm der Ammer bei Wielenbach)	40
Abb. 15: Ganglinie von Primidon (links) und PEMA (rechts) in der Wasserphase und im Sediment über eine Testdauer von 107 Tagen ( $c_0 = 33$ µg/l, Mittelwerte eines doppelten Ansatzes)	41
Abb. 16: Reproduktionsraten (Mittelwert und Standardabweichung) im 21d-Daphnientest bei Inkubation einer Mischung (1:1) von Primidon und PEMA im Vergleich zum Kontrollansatz. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf Messwerte, deren Stabilität im Versuchsverlauf überprüft wurde	42
Abb. 17: Arzneimittelkonzentrationen im Sickerwasser (SW) der Säule 1	44
Abb. 18: Arzneimittelkonzentrationen im Sickerwasser (SW) der Säule 2	44
Abb. 19: Arzneimittelkonzentrationen im Sickerwasser (SW) der Säule 3	45
Abb. 20: Säulenfräsgerät	46
Abb. 21: Arzneimittelkonzentrationen im Sickerwasser (SW) der Aquifersäule 2	48
Abb. 22: Arzneimittelkonzentrationen im Sickerwasser der Aquifersäule 3	48
Abb. 23: Wiederfindungsraten der Arzneimittelwirkstoffe im Sickerwasser	49
Abb. 24: Arzneimittelkonzentrationen in den stündlichen Mischproben der Halbschalenabflüsse im ungestörten Auenboden (links Halbschalen in 90 cm Tiefe; rechts Halbschalen in 150 cm Tiefe)	50
Abb. 25: Arzneimittelkonzentrationen in den stündlichen Mischproben der Halbschalenabflüsse im geschütteten Kiesboden (links Halbschalen in 90 cm Tiefe; rechts Halbschalen in 150 cm Tiefe)	50
Abb. 26: Sulfamethoxazol-Konzentrationen in Flüssen, Brunnen und Rohwasser (anonymisiert)	55
Abb. 27: Primidon-Konzentrationen in Flüssen, Brunnen und Rohwasser (anonymisiert)	55
Abb. 28: PEMA-Konzentrationen in Flüssen, Brunnen und Rohwasser (anonymisiert)	56

Abb. 29: Carbamazepin-Konzentrationen in Flüssen, Brunnen und Rohwasser (anonymisiert)	56
Abb. 30: CBZ-Epoxid-Konzentrationen in Flüssen, Brunnen und Rohwasser (anonymisiert)	57
Abb. 31: CBZ-DiOH-Konzentrationen in Flüssen, Brunnen und Rohwasser (anonymisiert)	57
Abb. 32: Amidotrizoesäure-Konzentrationen in Flüssen, Brunnen und Rohwasser (anonymisiert)	58
Abb. 33: Antibiotikum SMX und sein Human-Metabolit Ac-SMX in der zweistufigen Belebungsanlage KBA-M2 (A) sowie der Membrananlage MBA-MH (B): im Rohabwasser RohAW), in der wässrigen Phase des Belebtschlammes (MBA-MH, BS-Überstand), im Zulauf Belebungs- und im Kläranlagenablauf (für KBA-M2 im Sommer vor und nach der UV-Desinfektion) (BB1 = Belebungsbecken 1, Hochlaststufe, BB2 = Belebungsbecken 2, Niedriglaststufe)	71
Abb. 34: SMX-Konzentrationen (Einzelwerte der Parallelansätze a und b) und DOC-Elimination (Mittelwerte aus 2 Parallelansätzen und Standardabweichung) der Batch-Ansätze (KA-1 = Kontrollansatz, VA-2 und VA-3 Versuchsansätze mit SMX) der Adaptions- und Versuchsphase	73
Abb. 35: SMX-Konzentrationen, 3-Amino-5-methyl-isoxazol (gemessene und theoretisch berechnete Konzentration aus der SMX-Zugabe), und die SMX-Zudosierung der beiden Versuchsansätze VA2 und VA3 während der Adaptionphase; dargestellt als Mittelwerte aus 2 Parallelansätzen mit Standardabweichungen	74
Abb.36: Darstellung repräsentativer Kolonietypen der ZW-Isolate (10-fache Vergrößerung: ZWB19, ZWB27, ZWC4, ZWC10A, ZWC35, ZWC38A; 20-fache Vergrößerung: ZWC50, ZWC36, ZWC34, ZWC45; 30-fache Vergrößerung: KWC27, ZWB18, ZWC44 und 40-fache Vergrößerung: ZWC47)	76
Abb. 37: Mikroskopische Aufnahmen der ZW-Isolate des Kolonietyps 5 (Stern): Phasenkontrast-, Hellfeld-Bilder (Färbung mit Safranin) und Epifluoreszenz-Aufnahmen nach FISH mit der spezifischen Sonde für Eukarya (rote Fluoreszenz) und nach DNA-Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blaue Fluoreszenz)	76
Abb. 38: In situ Nachweis verschiedener Bakteriengruppen in den Biozönosen des Inokulums (Belebtschlamm, KBA-M2, BB1) sowie der Ansätze des Batch-Versuches (KA-1 = Kontrollansatz, VA-2 und VA-3 Versuchsansätze mit SMX) am Ende der Adaptionsphase (Phase 1) und der Versuchsphase (Phase 2) mit FISH	79
Abb. 39: Epifluoreszenz-Aufnahmen: SMX-angereicherte Schlamm-biozönosen nach FISH mit der spezifischen Sonde für <i>Actinobacteria</i> (A) und <i>Chloroflexi</i> (B)	79
Abb. 40: DGGE-Profile der Bakteriengruppen <i>Actinobacteria</i> (A) und <i>Chloroflexi</i> (B) für das Inokulum (M2, BB1) und die Biozönosen der der Ansätze des Batch-Versuches (KA-1 = Kontrollansatz, VA-2 und VA-3 Versuchsansätze mit SMX) am Ende der Adaptionsphase (Phase 1) und der Versuchsphase (Phase 2); M = Marker	81
Abb. 41: In situ-Nachweis der Gruppen <i>Betaproteobacteria</i> , <i>Alphaproteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Mycolata</i> sowie der Gattungen <i>Zoogloea</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Brevundimonas</i> und <i>Gordonia</i> in den Biozönosen des Inokulums (Belebtschlamm, KBA-M2, BB1) sowie der Ansätze des Batch-Versuches (KA-1 = Kontrollansatz, VA-2 und VA-3 Versuchsansätze mit SMX) am Ende der Adaptionsphase (Phase 1) und der Versuchsphase (Phase 2) mit FISH	83
Abb. 42: Biomasseentwicklung gemessen als optische Dichte (OD, Mittelwerte der 3 Parallelansätze mit der korrespondierenden Standardabweichung) in den vier Versuchsansätzen A (Acetat, Ammoniumnitrat und SMX), B (SMX, Ammoniumnitrat), C (SMX) und D (Acetat und SMX); Gesamtzellzahl (GZZ nach 40 d Inkubation, AO = Acridinorange) sowie die	

Acetatkonzentrationen (Mittelwerte der 3 Parallelansätze mit der korrespondierenden Standardabweichung) der Versuchsansätze A und D	84
Abb. 43: SMX-Konzentrationen (Mittelwerte der 3 Parallelansätze mit der korrespondierenden Standardabweichung) der vier Versuchsansätze A (Acetat, Ammoniumnitrat und SMX), B (SMX, Ammoniumnitrat), C (SMX) und D (Acetat und SMX)	85

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Gradientenprogramm für die Bestimmung von Arzneimittelwirkstoffen mit analytischer Säule Phenomenex Synergi Polar Plus 4 µm	18
Tab. 2: Konzentration von Carbamazepin und den humanen Metaboliten im Kläranlagenzu- und ablauf in ng/l (24h-Mischprobe, nicht korrespondierend, aus Miao et al., 2005)	23
Tab. 3: Carbamazepin und dessen Metaboliten in deutschen Oberflächengewässern	23
Tab. 4: Wiederfindungsraten von Arzneimittelwirkstoffen/Metaboliten im Sickerwasserabfluss der Bodensäulen	45
Tab. 5: Korngrößenverteilungen, pH-Werte und TOC-Gehalte der Aquifersäulen	46
Tab. 6: Liste der in die Untersuchungen einbezogenen Wasserversorgungsunternehmen	52
Tab. 7: Beprobte Brunnen (anonymisiert)	53
Tab. 8: Dosierung von Acetat (Na-Ac) und SMX bzw. Ammoniumnitrat während der Versuchsphasen 1 und 2 (Zugabe Nährmedium 2x/Woche, Konzentrationen in mg/l)	64
Tab. 9: Verwendete rRNA-gerichtete Oligonukleotidsonden mit den zu detektierenden Zielorganismen sowie für die Hybridisierung verwendete Formamidkonzentrationen	66
Tab. 10: Verwendete Primer zur Amplifikation und Sequenzierung der 16S rDNA und der Sulfonamid-Resistenzgene mit Spezifität, eingesetzter Methode sowie PCR-Bedingungen	67
Tab. 11: Filtrierte Probenvolumina aus den Kläranlagen-Kompartimenten für den Nachweis von Sulfonamid-Resistenzgenen (BB=Belebungsbecken, BS=Belebtschlamm)	68
Tab. 12: Bedingungen in den Versuchsansätzen zum SMX-Abbau mit Reinkulturen	69
Tab. 13: Koloniemorphologie der ZW-Isolate, kultiviert auf ZWB- und ZWC-Festmedium	75
Tab. 14: Charakterisierung und Identifizierung der Bakterienisolate anhand von Kolonie- und Zellmorphologie, Gram-Färbung, RFLP-Gruppen und phylogenetische Zuordnung der 16S rDNA Vollsequenzen (> 1400 bp) mit Hilfe der BLAST-Analyse (Basic Local Alignment Search Tool, <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> , Altschul et al., 1990); mit Stern markierten Isolate wurden für die spezifischen SMX-Abbautests eingesetzt (Kapitel 4.3.1)	77
Tab. 15: Phylogenetische Zuordnung der DGGE-Banden-Sequenzen (Teilsequenz der 16S rDNA, 200-500 bp) mit Hilfe der BLAST-Analyse (Basic Local Alignment Search Tool, <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> , Altschul et al., 1990)	82
Tab. 16: Sulfonamid-Resistenzgene in den einzelnen Kläranlagen-Kompartimenten (RohAW = Rohabwasser, BB1 = Hochlaststufe, BB2 = Niedriglaststufe, BS = Belebtschlamm) in den Anlagen KBA-M2 (konventionelle zweistufige Belebungsanlage) und MBA-MH (einstufige Membranbelebungsanlage)	86





## Kurzfassung

Der Eintrag von Arzneimittelwirkstoffen und deren Metaboliten über Abwasserreinigungsanlagen in die Gewässer ist vielfach dokumentiert und kann neben einer Bedrohung des aquatischen Lebensraums auch die Qualität von Trinkwasser bei Gewinnung von Uferfiltraten beeinträchtigen. So sind in der Literatur inzwischen Analysenverfahren und Expositionswerte für ca. 200 Wirkstoffe zu finden. Erst seit kurzem nimmt auch die Zahl der Veröffentlichungen zu Arzneimittelmetaboliten zu, nachdem erkannt wurde, dass Metaboliten z.T. in höheren Konzentrationen als ihre Ausgangsverbindungen im Wasser auftreten können.

Zu Beginn des Projekts „Arzneimittelwirkstoffe und deren Metaboliten: Belastungen des Wasserkreislaufs und Möglichkeiten der Verminderung“ wurde eine Auswahl der in den verschiedenen Teilprojekten zu bearbeitenden Einzelstoffe getroffen. Für folgende **Wirkstoffe und deren Metaboliten** (Abkürzungen jeweils in Klammern) wurden **Analysenverfahren** etabliert:

Sulfamethoxazol (SMX) und N<sup>4</sup>-Acetylsulfamethoxazol (Ac-SMX); Primidon und 2-Phenyl-2-ethylmalonamid (PEMA); Carbamazepin (CBZ), 10,11-Dihydro-10,11-epoxycarbamazepin (CBZ-Epoxid) und 10,11-Dihydro-10,11-dihydroxycarbamazepin (CBZ-DiOH); Diclofenac (DCF) und 4-Hydroxydiclofenac (Hydroxy-DCF); Ritalin und Ritalinsäure; Allopurinol und Oxipurinol.

Für Ritalinsäure und Oxipurinol liegen bisher in der Literatur keine Angaben zum Vorkommen in der Umwelt vor.

Zum besseren Verständnis der **Eliminationsprozesse** wurde das **Sorptions- und Abbauverhalten** der o.g. Substanzen untersucht. In den Standardabbautests erfüllte keine der untersuchten Substanzen die Kriterien der leichten oder der potenziellen biologischen Abbaubarkeit. Hinweise auf eine teilweise Mineralisierung gab es bei Primidon, SMX und Ac-SMX. Unter umweltrelevanten Bedingungen zeigten Simulationstests mit Laborkläranlagen, dass die Arzneimittel-/Metaboliten in unterschiedlichem Ausmaß eliminiert werden. Dabei scheint die Eliminationsrate der einzelnen Substanzen in erster Linie von den Stoffeigenschaften bzw. den Substanzklassen abzuhängen, was der Vergleich der gut abbaubaren Sulfonamide (SMX, Ac-SMX und Glu-SMX) bzw. der schlechten Elimination von Primidon/PEMA zeigt. Ebenfalls ersichtlich wurde, dass die Metaboliten hinsichtlich ihrer Abbaubarkeit keine deutliche Verbesserung im Vergleich zu den Muttersubstanzen zeigen, d.h. durch die Zunahme der Polarität wird keine signifikante Verbesserung der Abbaubarkeit induziert. Hinzu kommt, dass beim biologischen Abbau manche Metaboliten (Ac-SMX, Glu-SMX) wieder zur Muttersubstanz zurückgebildet werden.

Aus dem Vergleich der Standardtests mit den Laborkläranlagen wird deutlich, dass die Verwendung von standardisierten Testverfahren zur Einschätzung des Abbaus von Spurenstoffen in Kläranlagen eine große Fehlermöglichkeit birgt und die Ergebnisse im Einzelfall unter umweltrelevanten Bedingungen überprüft werden müssen. Deshalb wurde in diesem Projekt an einer Kläranlage eine Messkampagne durchgeführt, bei der Auftreten und Elimination der Arzneimittelwirkstoffe/-Metaboliten im Verlauf der realen Kläranlage bestimmt wurde.

Die verkaufstarken Arzneimittel wie Carbamazepin, Diclofenac und SMX sowie deren Metaboliten zeigen Ablaufkonzentrationen im µg/l-Bereich. Primidon/PEMA und Ritalinsäure mit geringeren, einstelligen Jahrestonnagen finden sich in Konzentrationen von 100-300 ng/l, wobei Ritalinsäure in Kläranlagen erstmalig nachgewiesen wurde. Generell lagen die Konzentrationen des jeweiligen Wirkstoffs und seines humanen Metaboliten in der gleichen Größenordnung. Die Eliminationsraten der einzelnen Substanzen in der realen Kläranlage stehen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Laborkläranlagen: guter Abbau der Sulfonamide SMX/Ac-SMX sowie schlechte Elimination von CBZ, CBZ-DiOH, Primidon, PEMA, DCF, Hydroxy-DCF und Ritalinsäure.

Um im weiteren Verlauf des Wasserkreislaufs das Verhalten der Arzneimittelwirkstoffe/-Metaboliten im Oberflächengewässer zu simulieren, wurde mit SMX/Ac-SMX und mit Primidon und PEMA der Wasser-Sedimenttest durchgeführt. Während die gute Abbaubarkeit der Sulfonamide auch im Oberflächengewässer bestätigt wurde, konnte bei Primidon und PEMA nur eine geringe Elimination, die im Wesentlichen auf Sorption beruht, nachgewiesen werden. Damit sind Primidon und PEMA als „vP“-Stoffe im Sinne des Annex XIII der REACH-Verordnung einzustufen.

Das **Transportverhalten** der o.g. Substanzen während der Bodenpassage wurde in Säulen- und Lysimeterexperimenten sowie an uferfiltratbeeinflussten Brunnen untersucht. Die Versuchsansätze mit ungesättigten Bodensäulen und wassergesättigten Aquifersäulen führten hinsichtlich des Rückhaltevermögens des Bodens zu weitestgehend vergleichbaren Ergebnissen. Hiernach wurde das Antibiotikum SMX im Boden nach einer mehrwöchigen Adaptionsphase wahrscheinlich mikrobiell vollständig abgebaut. Ac-SMX wird vollständig zurückgehalten oder abgebaut. Dagegen ist das Rückhaltevermögen des Bodens gegenüber dem Antiepileptikum Primidon und seinem Metaboliten PEMA nach wenigen Monaten erschöpft. Das Antiepileptikum Carbamazepin und sein Metabolit CBZ-Epoxid wurden in den ungestörten Boden- / Aquifersäulen sowie in den Lysimetern zum größten Teil zurückgehalten. In einem Säulenversuch wurde CBZ sogar vollständig zurückgehalten. Der Metabolit CBZ-DiOH war dagegen in den Böden sehr mobil.

Die Übertragbarkeit der in Säulen- und Lysimeterversuchen gewonnenen Ergebnisse wurde unter Berücksichtigung standortspezifischer Eigenschaften an Brunnen mit relevantem Uferfiltratanteil überprüft. Die Stoffkonzentrationen der von Oberflächenwasser beeinflussten Brunnen liegen weitgehend in der Größenordnung der benachbarten Fließgewässer. Dies bedeutet, dass bei einer Fließdauer von etwa 30-200 Tagen keine wesentliche Elimination der untersuchten Stoffe im Untergrund stattfindet. Da ohne weitere Trinkwasseraufbereitung ggf. auch mit entsprechenden Konzentrationen im Reinwasser zu rechnen ist, ist eine Kontamination des Trinkwassers mit Arzneimittelwirkstoffen und deren Metaboliten nicht auszuschließen.

Der geringe Rückhalt des Bodens gegenüber den untersuchten Stoffen während der Uferfiltratpassage (Oberflächengewässer-Brunnen) ist wahrscheinlich auf die lange Kontaktzeit des Bodens mit den entsprechenden Substanzen zurückzuführen. So liegen Arzneimittelwirkstoffe wie z.B. CBZ schon seit über 40 Jahren in der Umwelt vor, d.h. die Sorptionsflächen im Boden sind über diesen Zeitraum aufgesättigt worden. Im Gegensatz dazu wird in Säulenversuchen i.d.R. unbelasteter Boden eingesetzt, der noch die vollen Sorptionseigenschaften besitzt.

Die Konzentrationen der Metaboliten in Kläranlagen, Oberflächengewässern und im Uferfiltrat liegen meist in der gleichen Größenordnung wie die der Wirkstoffe selbst. Hinsichtlich des Auftretens, Abbaus und der Verteilung zeigen humane Arzneimittelmetaboliten ein ähnliches Verhalten wie die Arzneimittel selbst. Somit ist auch bei den Arzneimittelmetaboliten von einer eindeutigen Umweltexposition auszugehen. Wie hoch die Gefährdung der Umwelt durch die Arzneimittelmetaboliten ist, kann aufgrund fehlender Daten zur Ökotoxizität nicht geklärt werden.

Zur Ermittlung der **Mikrobiologie des Abbaus von Sulfamethoxazol** wurden zunächst Eliminationsraten realer Kläranlagen ausgewertet. Die Sorption von SMX an Belebtschlamm war mit 1 % sehr niedrig. Die beobachtete SMX-Elimination ist also auf biologischen Abbau zurückzuführen. In einer kommunalen zweistufigen Belebungsanlage (30-80% SMX-Elimination) war die SMX-Elimination nach Rückbildung des Humanmetaboliten Ac-SMX zur Muttersubstanz im Vergleich zu einer Membranbelebungsanlage (40-100% SMX-Elimination) etwas geringer. Bei letzterer ist im Gegensatz zu konventionellen Anlagen mit hohem Schlammalter auch die Aktivität der Biozönose immer noch sehr hoch, was eine effektivere SMX-Elimination ermöglicht.

Belebtschlammversuche zur Anreicherung von SMX-abbauenden Mikroorganismen durch semikontinuierliche Zugabe von SMX als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle oder als Cosubstrat zeigten,

dass die Schlammbiozöosen SMX grundsätzlich als C- und N-Quelle für ihr Wachstum nutzen können. Dabei wird SMX – trotz einer z.T. 100 %igen Elimination - nicht vollständig mineralisiert. Es bildet sich der Metabolit 3-Amino-5-methyl-isoxazol, der unter den hier untersuchten Umweltbedingungen (Aerobie und Raumtemperatur) stabil zu sein scheint. Zusätzliche Abbauprobversuche mit einem Konsortium SMX-abbauender Bakterienisolate aus der Anreicherungskultur des Batchversuchs bestätigen eine bakterielle SMX-Metabolisierung, die Nutzung von SMX als C-Quelle in Anwesenheit von Ammoniumnitrat als N-Quelle, die Nutzung von SMX als N-Quelle bei gleichzeitiger Verfügbarkeit von Acetat sowie die Nutzung von SMX als einzige C- und N-Quelle. Weiter erfolgt eine schnellere SMX-Elimination bei N-Mangel und gleichzeitiger Verfügbarkeit einer leicht abbaubaren C-Quelle zur Energieversorgung. Als für den SMX-Abbau relevante Mikroorganismengruppen ergaben sich neben noch zu identifizierenden Pilzen Vertreter aus den Bakteriengruppen *Alpha*- und *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria* sowie *Chloroflexi*. In den Gruppen der *Alphaproteobacteria* und *Actinobacteria* finden sich stoffwechselflexible Bodenbakterien mit hohem Abbaupotential für verschiedenste Kohlenstoffquellen. Bakterien der *Chloroflexi* sind phototroph, nutzen also Licht als Energiequelle, und könnten daher für den SMX-Abbau in oberflächennahen Bodenschichten und Gewässern von Bedeutung sein.

Als mögliche Auswirkung auf die Umwelt ergibt sich, dass ein mikrobieller SMX-Abbau in organisch belastetem Milieu mit verfügbaren Energiequellen effektiver sein sollte als in kohlenstoffarmer Umgebung. Energiemangel hingegen verzögert die SMX-Elimination erheblich. Daher sind Nitrifikationsstufen weniger effektiv als Hochlaststufen. Da SMX-Abbau insbesondere bei Mangel an Stickstoff gefördert wird, ist er v.a. in anoxischen Bereichen mit Denitrifikation zu erwarten, z.B. in Kläranlagen oder Böden. Dabei sollte aufgrund der Verfügbarkeit an C-Quellen der SMX-Abbau besser in Böden mit hohem Gehalt an organischen Substanzen gelingen als in mineralischen Böden. Überdüngte Böden mit hohem N-Gehalt hingegen sollten dem SMX-Abbau eher entgegenstehen. Aufgrund langer Adaptionszeiten erscheint für einen effektiven SMX-Abbau in Kläranlagen eine Erhöhung des Schlammalters sinnvoll, allerdings nur dort, wo zusätzlich eine hohe Aktivität der Biomasse gewährleistet ist, z.B. in Membranbelebungsanlagen. Die langen Adaptionszeiten erschweren den SMX-Abbau möglicherweise dort, wo stark schwankende Abwassermengen und/oder stark schwankende Arzneimittelkonzentrationen vorliegen, z.B. in Anlagen mit geringer Einwohnerzahl.

Die Plasmid-gebundenen SMX-Resistenzgene Sul1-3 wurden in ersten Untersuchungen in Kläranlagenkompartimenten und –abläufen nachgewiesen. Zur realistischen Abschätzung des Umweltrisikos müssen Sul-Gene auch direkt im Faulschlamm und im Gewässer verlässlich nachgewiesen und quantifiziert werden. Dies ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Für das Teilprojekt „**Naturnahe Abwasserreinigungsverfahren**“ wird auf den beiliegenden detaillierten Abschlussbericht 2009 „Naturnahe Verfahren der Biologischen Abwasserbehandlung – Abbau von Arzneimitteln und Estrogenen in naturnahen Kläranlagen“ verwiesen. Da der Eintrag von Arzneimittelwirkstoffen in kleinen, naturnahen Kläranlagen sehr großen Schwankungen unterliegt, sind Untersuchungen möglichst mit korrespondierenden Probennahmen durchzuführen. Obwohl dies in manchen Fällen nicht möglich war, zeigen die Ergebnisse (Mediane) doch, dass Arzneimittelwirkstoffe in naturnahen Abwasserreinigungsanlagen grundsätzlich zurückgehalten bzw. eliminiert werden können. Da diese Anlagen aber großen Schwankungen unterliegen, sind Zu- und Ablaufwerte in einer Größenordnung von zweistelligen µg/l-Werten keine Seltenheit.

# 1 Einführung

## 1.1 Konzept und Projektziele

In den letzten 10 Jahren wurden am LfU verschiedene Projekte zum Auftreten und zur Wirkung von Arzneimittelwirkstoffen in der aquatischen Umwelt durchgeführt. Die gewonnenen Daten und Erfahrungen wurden u.a. in bundesweit tätige Gremien wie z.B. den Bund/Länder-Ausschuss Chemikaliensicherheit (BLAC) eingebracht.

Auf Grund der Stoffvielfalt sowie der umfangreichen Fragestellungen haben mehrere Referate des LfU im Jahr 2005 weitere Projekte zum Thema Arzneimittel vorgeschlagen, mit denen Wissenslücken in folgenden Bereichen geschlossen werden sollen:

- Untersuchung bisher nicht betrachteter Arzneimittelwirkstoffe und v.a. Untersuchung von Metaboliten im aquatischen System
- Verständnis für Eliminationsprozesse wie Sorption und Abbau
- Transportverhalten in oberirdischen Gewässern, in Sickerwasser und Grundwasser

Die einzelnen Projekte wurden schließlich in einem gemeinsamen Projekt „Arzneimittelwirkstoffe und deren Metaboliten: Belastungen des Wasserkreislaufs und Möglichkeiten der Verminderung“ zusammengefasst.

Es wurden folgende Projektziele formuliert:

- Erarbeitung der erforderlichen Analysenverfahren für ausgewählte Arzneimittelwirkstoffe und deren Metaboliten
- Aufklärung des mikrobiellen Stoffumsatzes beim Abbau von Arzneimittelwirkstoffen
- Nachweis, Ausbreitung und Verbleib von Arzneimittelwirkstoffen und deren Metaboliten in Kläranlagen, Oberflächengewässern sowie Sicker- und Grundwasser
- Nachweis und Transport der Stoffe in der gesättigten und ungesättigten Bodenzone
- Erarbeitung von Aussagen zu Eliminationsprozessen in Abwasserreinigungsanlagen und Gewässern (Untersuchungen mit Schwerpunkt auf naturnahe Abwasserreinigungsverfahren sind in einem gesonderten Bericht zusammengestellt)

Durch ein besseres Verständnis des stofflichen Verhaltens von Arzneimittelwirkstoffen und deren Metaboliten sollen notwendige und/oder erforderliche Handlungsoptionen in den Bereichen Abwasserentsorgung, Wasserversorgung sowie im Bereich der Gewässerökologie aufgezeigt werden.

Eine Zusammenarbeit mit externen Partnern (Universitäten) war ausdrücklich erwünscht und wurde durch Kooperation mit zwei Lehrstühlen der TU München realisiert.

## 1.2 Projektverlauf und Projektbeteiligte

Das Projekt „Arzneimittelwirkstoffe und deren Metaboliten: Belastungen des Wasserkreislaufs und Möglichkeiten der Verminderung“ wurde im September 2006 vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit für den Zeitraum 01.10.2006 bis 31.12.2009 genehmigt.

Für das Teilprojekt „Naturnahe Abwasserreinigungsverfahren“ wurde mit der TU München, Limnologische Station Iffeldorf, Prof. Dr. A. Melzer, ein Werkvertrag abgeschlossen.

Für das Teilprojekt zum mikrobiellen Stoffumsatz wurde mit der TU München, Institut für Siedlungswasserwirtschaft, Prof. Dr. H. Horn, ein Werkvertrag abgeschlossen.

Am Projekt waren folgende Referate und Mitarbeiter des LfU sowie externe Partner beteiligt:

Referat 75: Dr. Manfred Sengl (Gesamtleitung), Adriana Ripperger und Stefanie Melzer (Projektpersonal), Walter Schüßler, Nicole Gröger

Referat 67: Elke Zahner-Meike, Claudia Koschi – TU München, Limnologische Station Iffeldorf: Daniela Thiele (Projektpersonal, Doktorandin), Dr. Uta Raeder – StMUG: Dr. Tanja Gschlößl (Beratung)

Referat 76: Dr. Marion Letzel (Projektpersonal), Dr. Michael Gierig, Elfriede Grill, Dietmar Leppert, Friedrich Rehberger, Ursula Rexer, Luise Wölfle, Dr. Klaus Weiß (Projektpersonal)

Referat 77: Dr. Hilde Lemmer, Monika Hanf – TU München, Institut für Siedlungswasserwirtschaft: Dr. Elisabeth Müller (Projektpersonal), Diplomanden Andreas Arbeiter, Julia Vierheilig, Tina Reutelshöfer sowie Clemens Schmied.

## 2 Stoffauswahl und Analytik

### 2.1 Arzneimittelwirkstoffe und deren Metaboliten

Derzeit sind in der Literatur für rund 200 Arzneimittelwirkstoffe Analysenverfahren und Messergebnisse in Umweltproben verfügbar. Nur in den wenigsten Fällen sind die jeweiligen Metaboliten identifiziert und untersucht worden. Allerdings kann für die letzten beiden Jahre ein verstärktes Interesse verschiedener Arbeitsgruppen für die Metaboliten-Thematik festgestellt werden, so dass die Zahl entsprechender Veröffentlichungen aktuell deutlich ansteigt (Celiz et al., 2009).

Unter Metaboliten versteht man die Zwischen- bzw. Umwandlungsprodukte in Stoffwechselvorgängen. Metaboliten von Arzneimittelwirkstoffen können

- im menschlichen Körper und/oder
- in der Umwelt

entstehen. Im Einzelfall kann der im menschlichen Körper entstandene Metabolit die eigentlich pharmakologisch wirksame Komponente darstellen. Im menschlichen Körper werden zur leichteren (insbesondere renalen) Ausscheidung Metaboliten mit polaren Gruppen verbunden (z.B. Bildung von Glucuroniden, Sulfaten). Diese Gruppen können später im Abwasser oder während des Klärprozesses vergleichsweise leicht wieder abgespalten werden.

Metaboliten sind in der Regel deutlich polarer als die Ausgangsverbindungen und damit analytisch schwerer fassbar. Auf der anderen Seite sind nur relativ wenige Metaboliten als Vergleichssubstanzen kommerziell verfügbar, so dass häufig keine Analytik aufgebaut werden kann. Es besteht die Möglichkeit, derartige Substanzen in Syntheselabors herstellen zu lassen, aber dies ist mit hohen Kosten verbunden. Im Einzelfall können Metaboliten über die Herstellerfirmen der entsprechenden Wirkstoffe erhalten werden.

Für das Projekt sollten Arzneimittelwirkstoffe ausgewählt werden, deren Metaboliten – zumindest teilweise – bekannt und auch verfügbar sind. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine ausführliche Literaturrecherche durchgeführt.

Der Ausgangspunkt für die Untersuchung von Arzneimittelwirkstoffen in der Umwelt in Deutschland waren zufällige Befunde von **Clofibrinsäure**, des Hauptmetaboliten des Lipidsenkers **Clofibrat** in Berliner Wässern (Stan und Linkerhägner, 1992). Da Clofibrat inzwischen von anderen lipidsenkenden Wirkstoffen abgelöst worden ist, wurde Clofibrinsäure nicht in die Untersuchungen aufgenommen.

Als einer der ersten Arzneimittelmetaboliten wurde **Hydroxyibuprofen** als Hauptabbauprodukt des Schmerzmittels **Ibuprofen** beschrieben (Stumpf et al., 1998). Eine Vergleichssubstanz ist dafür aber nicht verfügbar.

Das in Oberflächengewässern, aber auch im Trinkwasser nachgewiesene Antibiotikum **Sulfamethoxazol** (SMX) wird vorwiegend als **N<sup>4</sup>-Acetylsulfamethoxazol** oder als **Sulfamethoxazol-N<sup>1</sup>-Glucuronid** ausgeschieden. N<sup>4</sup>-Acetylsulfamethoxazol ist als Vergleichssubstanz verfügbar, das Glucuronid wurde im Rahmen einer Kooperation in der Universität Stuttgart hergestellt.

Das Antiepileptikum **Carbamazepin** wird primär in das pharmakologisch wirksame **10,11-Dihydro-10,11-epoxycarbamazepin** umgewandelt. In der aquatischen Umwelt wurde ein durchschnittliches Verhältnis von Ausgangsstoff zu Metabolit von 6:1 festgestellt (LFW, 2004a). In anderen Untersuchungen wurde gezeigt, dass als Hauptmetabolit **10,11-Dihydro-10,11-dihydroxycarbamazepin** entsteht, der in Wasserproben in höheren Konzentrationen als Carbamazepin selbst gefunden wird. Daneben

wurden auch die Metaboliten **2-Hydroxycarbamazepin**, **3-Hydroxycarbamazepin** sowie in Spuren **10-Hydroxycarbamazepin** in Kläranlagenabläufen identifiziert (Miao und Metcalfe, 2003). **10,11-Dihydro-10,11-dihydroxycarbamazepin** wurde als Vergleichssubstanz freundlicherweise vom Hersteller (Novartis Basel) zur Verfügung gestellt.

Das weit verbreitete Schmerzmittel **Diclofenac** wird nur zu 10-20% unverändert, aber zu ca. 50% in Form des Hauptmetaboliten **4'-Hydroxydiclofenac** ausgeschieden. Als weitere Metaboliten wurden **5-Hydroxy-**, **4,5-Dihydroxy-**, **3-Hydroxy-** und **3-Hydroxy-4'-methoxydiclofenac** identifiziert (Pérez und Barceló, 2008). 4-Hydroxydiclofenac ist als Vergleichssubstanz in geringen Mengen verfügbar. Stülten et al. (2008) fanden als weiteren Metaboliten **4'-Hydroxydiclofenac-dehydrat** in Kläranlagenabläufen.

Das als Gichtmittel eingesetzte **Allopurinol** wird nach oraler Applikation zu ca. 90 % resorbiert und rasch zu **Oxipurinol** als pharmakologisch wirksame Komponente oxidiert. Bisher sind keine Daten zu Oxipurinol in der Umwelt verfügbar. Beide Substanzen sind im Chemikalienhandel erhältlich.

Das Antiepileptikum **Primidon** wird in der Leber zum ebenfalls pharmakologisch wirksamen Metaboliten **Phenobarbital** und zu **2-Phenyl-2-ethylmalonamid (PEMA)** umgewandelt. Hummel et al. (2006) konnten Primidon in Kläranlagenabläufen, Oberflächengewässern und Trinkwässern nachweisen, während zum Metaboliten PEMA keine Daten vorliegen. Die jeweiligen Vergleichssubstanzen sind verfügbar.

Die hydroxylierten Metaboliten des Lipidsenkers **Atorvastatin (o-Hydroxy- bzw. p-Hydroxy-Atorvastatin)** wurden in den USA in Kläranlagenzuläufen nachgewiesen (Vanderford und Snyder, 2006). Die Metaboliten sind als Vergleichssubstanzen nicht verfügbar.

Das Psychopharmakum **Fluoxetin** wird im Urin anteilig als **Norfluoxetin** ausgeschieden und konnte in Kläranlagenzuläufen sowie –abläufen im unteren ng/l-Bereich nachgewiesen werden (Lajeunesse et al., 2008). Die Vergleichssubstanz war zu Beginn des Projektzeitraums nicht verfügbar.

Hinweise auf relevante Metaboliten können ggf. auch aus Abbautests wie z.B. dem Zahn-Wellenstest erhalten werden. Wenn bei den Abbautests die eingesetzten Substanzen nach Primärabbau bzw. weiterem biologischen Abbau in stabile Metaboliten umgewandelt werden, ist es im Einzelfall möglich, diese Metaboliten zu identifizieren und auf ihre Relevanz z.B. in Kläranlagenabläufen zu überprüfen. Am Universitätsklinikum Freiburg (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kümmerer) wurde z.B. ein stabiler Metabolit des Calciumantagonisten **Verapamil** aus dem Zahn-Wellenstestansatz isoliert und seine Struktur aufgeklärt. Auch eigene Ergebnisse des Zahn-Wellenstests zum Betarezeptorenblocker **Sotalol** sowie zum **Antibiotikum Sulfamethoxazol** deuten auf einen oder mehrere stabile Metaboliten hin (zum Sulfamethoxazolmetaboliten s. Kap. 3).

Für das Projekt wurden in den Jahren 2007-2009 folgende Arzneimittelwirkstoffe sowie deren Metaboliten zur Bearbeitung in den Teilprojekten ausgewählt:

- Sulfamethoxazol
- Primidon
- Allopurinol
- Diclofenac
- Carbamazepin

- Ritalin

Wegen des hohen zeitlichen Aufwands der jeweiligen Untersuchungen konnten nicht in allen Teilprojekten alle Substanzen dieser Liste betrachtet werden. Im Teilprojekt „Eliminationsprozesse“ wurde deshalb 2007/08 das Hauptaugenmerk auf das Antibiotikum Sulfamethoxazol und seine humanen Metaboliten, in den Jahren 2008/09 auf Primidon und Ritalin gelegt. Im Teilprojekt „Mikrobiologie“ wurde nur Sulfamethoxazol, seine Humanmetaboliten sowie mikrobiell entstandene Transformationsprodukte untersucht.

## 2.2 Analytik

Für dieses Projekt wurden die Analysen mit einem Quadrupol-MS/MS-Gerät (4000 QTrap, Applied Biosystems) nach hochdruckflüssigchromatographischer Trennung (HPLC-Anlage Fa. Jasco) durchgeführt. Nachdem dieses Gerät deutlich empfindlicher ist als die bislang eingesetzten Analysengeräte, konnte bei der Probenvorbereitung mit kleineren Anreicherungsfaktoren (z.B. 100 statt 1000) gearbeitet, beziehungsweise bei Vorliegen höherer Stoffkonzentrationen auf eine Anreicherung ganz verzichtet werden. So wurden Abwässer mittels direkter Injektion der wässrigen Probe nach Ultrazentrifugation der Probe analysiert, während schwach belastete Proben wie Uferfiltrate und Fließgewässer mit einer 50-fachen Anreicherung bearbeitet wurden.

Bei einem großen Teil der Proben konnte gemäß den strengen Vorgaben der Richtlinie 96/23/EG (Europäische Union, 1996) quantifiziert werden. Diese EG-Richtlinie beschreibt Anforderungen an die massenspektrometrischen Verfahren für bestimmte Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen, die jedoch auch auf andere LC-MS/MS-Untersuchungen übertragen werden können. Die wesentlichen Kriterien dieser Richtlinie sind:

- für den positiven Nachweis von organischen Kontaminanten werden bei der Verwendung von niedrig auflösenden Massenspektrometern (LC-LRMS = liquid chromatography-low resolution mass spectrometer) vier sogenannte Identifizierungspunkte gefordert. Man erreicht dieses Kriterium mit der Messung eines Vorläufer-Ions und zwei Tochter-Ionen, für die weitere Bedingungen erfüllt sein müssen.
- die zulässigen Höchsttoleranzen der relativen Ionenintensitäten der Tochter-Ionen von Standard und Probe liegen bei  $\pm 20\%$ . Die Toleranz bei den Retentionszeiten der Analyten zwischen Kalibrierlösung und Probe liegt bei  $\pm 2,5\%$ .

### Probenvorbereitung

Bei Uferfiltraten und Oberflächengewässern wurden von jeder Probe zwei Anreicherungen mit jeweils 50 ml durchgeführt. Bei Kläranlagenabläufen wurde nach Ultrazentrifugation (20.000 U/min, 5 min) 1 ml Probe ohne Anreicherung zur Messung gebracht.

Filtration: bei Bedarf über Glasfaserfilter = GF 6

Salzzugabe nur bei zu extrahierenden Proben: 1 % (Gew.) NaCl p.a., durch Glühen bei 450 °C gereinigt.

Interne Standards: Zugabe von Carbamazepin-d<sub>10</sub>, Sulfamethoxazol-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, Sotalol-d<sub>6</sub>, Metoprolol-d<sub>7</sub>, Atenolol-d<sub>10</sub>, Diclofenac-d<sub>4</sub>, und Primidon-d<sub>5</sub>, so dass eine Konzentration von jeweils 1 µg/l je Standardsubstanz in der Wasserprobe vorliegt.

Zur Überprüfung des Verhaltens der Analyten in komplexen Proben wie Kläranlagenzuläufen wurde auf Grund des hohen Aufwands vereinzelt das Standard-Additionsverfahren durchgeführt.



Festphase: SPE Column Chromabond Easy, Polypropylen, Korngröße 20µm, 200 mg, 6 ml, Mache-rey-Nagel,  $V_{\text{Extraktion}} = 3 \text{ ml/min}$ . Nach der Extraktion wird die Festphasenkartusche mit  $N_2$  bis zur Ge-wichtskonstanz getrocknet.

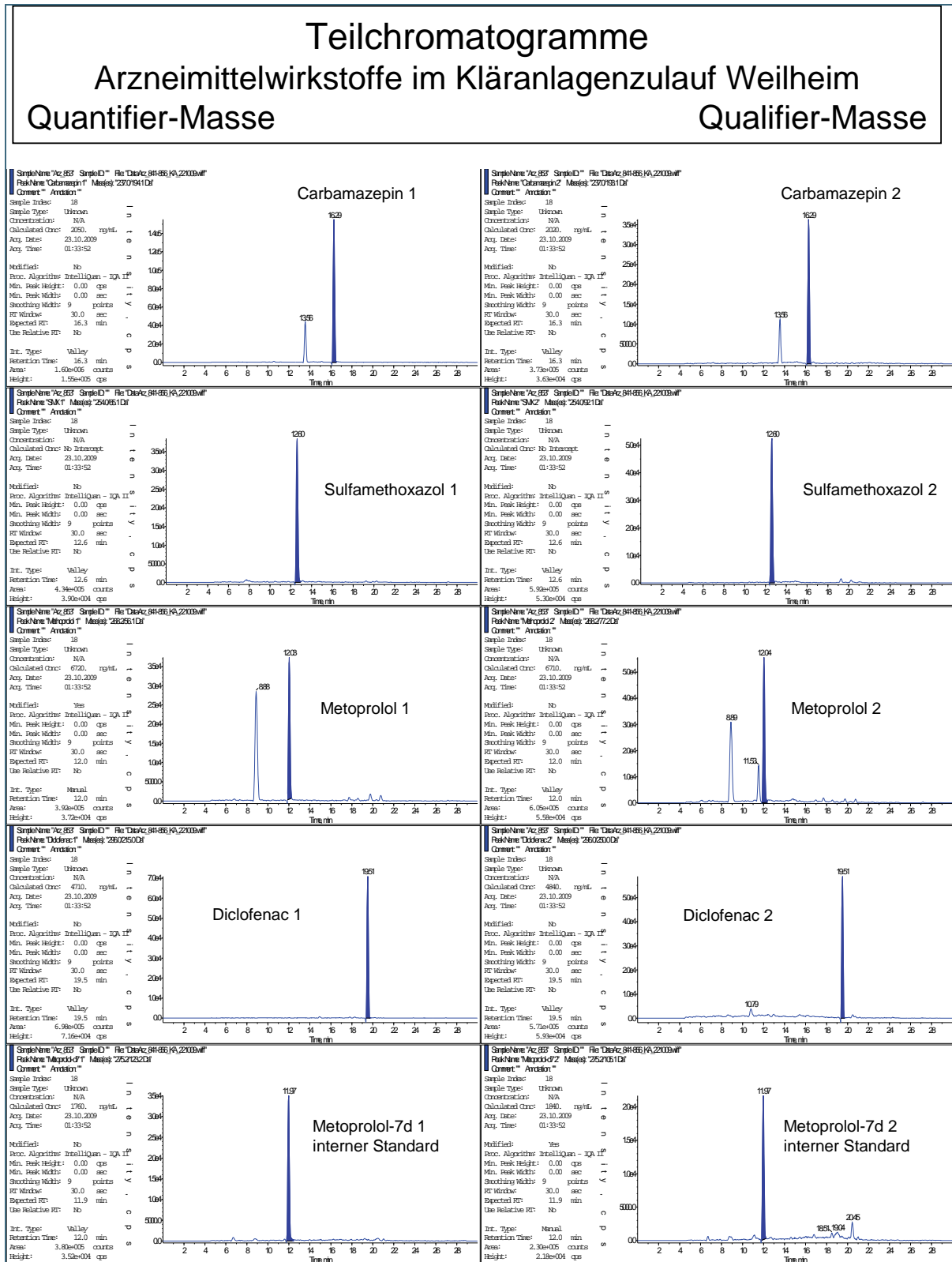


Abb. 1: LC-MS/MS-Beispielchromatogramme für ausgewählte Arzneimittelwirkstoffe

Für die Elution der verschiedenen Stoffgruppen wurden zwei Elutionsverfahren entwickelt. Die Elution erfolgte bei Normaldruck.

Methode 1 - Neutrale Elution: 4 ml Acetonitril (Lichrosolv, Merck), 2 x 4 ml Methanol (HPLC, Baker)

Vorteile der Methode 1: Allgemein bessere Ausbeute für Antibiotikawirkstoffe, wesentlich bessere Ausbeuten des säureempfindlichen Erythromycins (schnelle Metabolisierung bei pH < 7).

Methode 2 - Saure Elution: 4 ml Acetonitril, 2 x 4 ml Methanol (HPLC, Baker, 1,5 % Essigsäure)

Vorteil der Methode 2: Deutlich bessere Ausbeuten für die Gruppe der Betablockerwirkstoffe.

Trocknung der Eluate im N<sub>2</sub>-Strom.

Nach Aufnahme in 1,5 ml Vials mit Methanol / Wasser (10 / 90) wurden die Extrakte zur Messung gebracht.

### Messverfahren

Das LC-MS-System wurde mit folgenden Grundeinstellungen betrieben.

- Automatischer Probengeber X-LC 3059AS: Injektionsvolumen = 5 – 100 µl
- Säulenofen X-LC-3067CO: Ofentemperatur = 30 C°
- Pumpe PU-2085: Niederdruck-System, Flussrate 0,3 ml/min
- UV Detektor: Wellenlänge = 280 nm

Die LC-Bedingungen werden beispielhaft für die Übersichtsmethode zur Bestimmung von Arzneimittelwirkstoffen gezeigt und waren wie folgt:

Lösungsmittel A: Methanol + 0,05 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: Wasser + 0,05 % Ameisensäure

Druckeinstellungen: Min (MPa) = 2,00, Max (MPa): 40,00

Tab. 1: Gradientenprogramm für die Bestimmung von Arzneimittelwirkstoffen mit analytischer Säule Phenomenex Synergi Polar Plus 4 µm

Zeit (min)	Flussrate (ml/min)	Lösungsmittel A (%)	Lösungsmittel B (%)
0,00	0,300	10	90
18,00	0,300	90	10
23,00	0,300	90	10
24,00	0,300	10	90

Vorsäulen: Phenomenex Polar-RP, Säulendimension 4 x 2 mm, Partikelgröße 4 µm

Analytische Säule: Phenomenex Synergi Polar Plus, Säulendimension 150 x 2 mm, Partikelgröße 4 µm.

Gesamtlaufzeit (min): 30

Abb. 1 zeigt beispielhaft Teilchromatogramme der Quantifier- und der Qualifier-Massen eines Arzneimittelstandards, aufgenommen mit LC-MS/MS.

Die Ionisation erfolgte mit der sog. Elektrospray-Ionisation im Positiv-Modus, in wenigen Fällen war eine Messung im Negativ-Modus erforderlich.

Bei direkter Injektion von Wasserproben wurden Bestimmungsgrenzen von 50 ng/l, bei einer 50-fachen Anreicherung von 2-5 ng/l erreicht (Bestimmungsgrenze nicht statistisch ermittelt, sondern kleinste Kalibrierkonzentration angegeben).

### 2.3 Störungen bei der Analytik von Oxipurinol

Für die Bestimmung von Oxipurinol können bei der LC-MS/MS die Massenübergänge 151 → 108 und 151 → 42 herangezogen werden. Das Verhältnis der Tochtermassen 108 und 42 beträgt für Oxypurinol ca. 1:4.

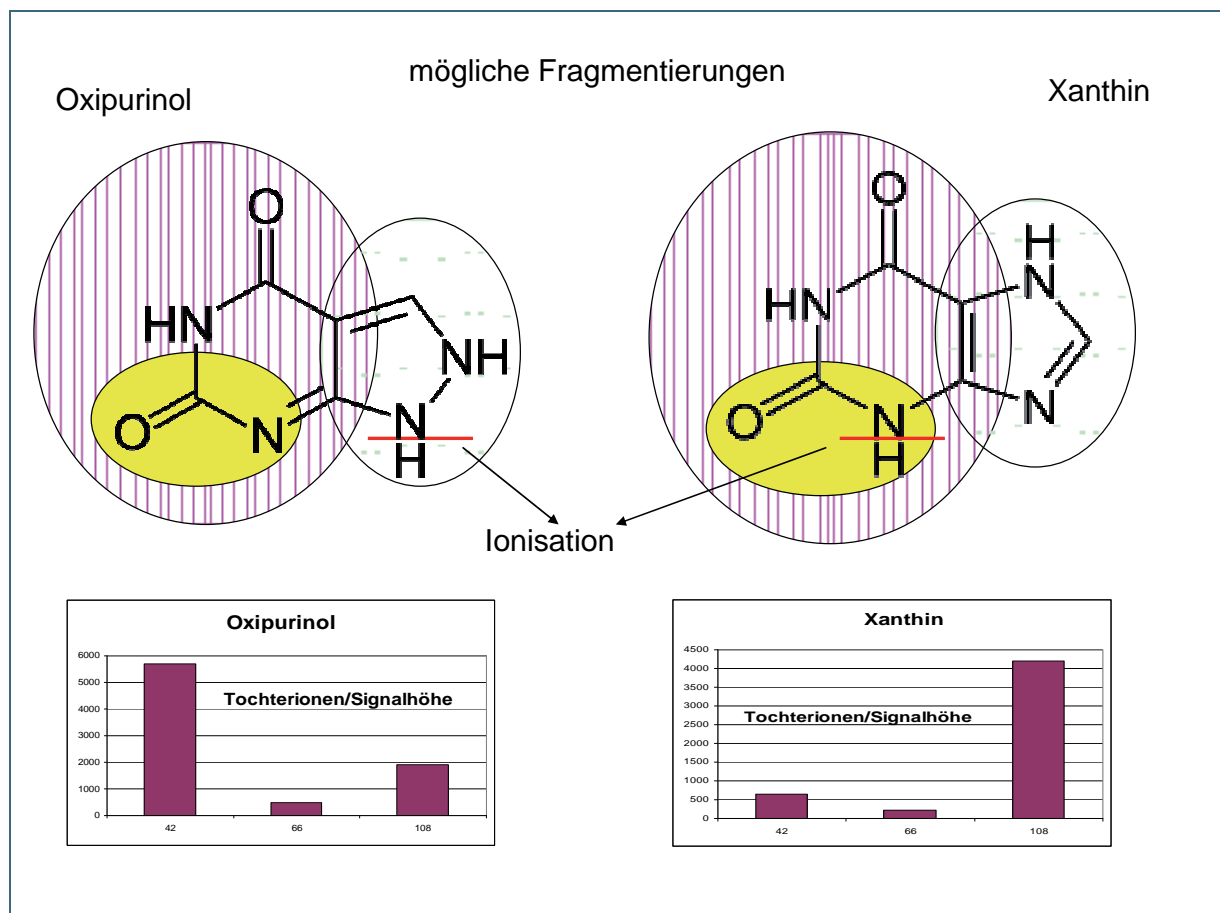


Abb. 2: Vorschlag für die Fragmentierung von Oxipurinol und Xanthin

Während bei der Kalibrierung keine Probleme festgestellt wurden, ergaben Messungen in realen Proben stark schwankende Verhältnisse der beiden Tochtermassen, die nur durch eine weitere Kompo-

nente mit gleichen Massenübergängen bei gleicher Retentionszeit hervorgerufen werden konnte. Da die beiden Tochtermassen vergleichsweise klein sind, ist die Wahrscheinlichkeit einer Störung durch chemisch ähnliche Verbindungen relativ hoch.

Eine Recherche möglicher Störverbindungen ergab einen Hinweis auf die Substanz Xanthin. Xanthin ist ein Abbauprodukt des Coffeins (zweifache Methylyabspaltung), das in großen Mengen in die Kläranlagen eingetragen wird und dort zu ca. 99 % in der biologischen Reinigungsstufe eliminiert wird. Die LC-MS/MS-Analyse ergab unter den für Oxipurinol gewählten Bedingungen identische Retentionszeiten und das Auftreten der gleichen Tochtermassen – diese allerdings in einem Verhältnis der Massen 108 und 42 von ca. 4:1 (s. Abb. 2). Dieses gegenüber Oxipurinol umgekehrte Massenverhältnis erklärt die stark schwankenden und daher schwer interpretierbaren Verhältnisse in realen Abwasser- und Oberflächenwasserproben.

Um Oxipurinol eindeutig identifizieren zu können, wurden verschiedenste Trennsäulen getestet, die laut Herstellerangaben für die Trennung sehr polarer Verbindungen besonders geeignet sein sollen. Schließlich konnte mit einer Säule der Fa. Macherey-Nagel (EC 250 x 2 mm Nucleodur C18 ISIS, Partikelgröße 3 µm) bei einer Flussrate von 0,2 ml/min eine Basislinientrennung erreicht werden (s. Abb. 3).

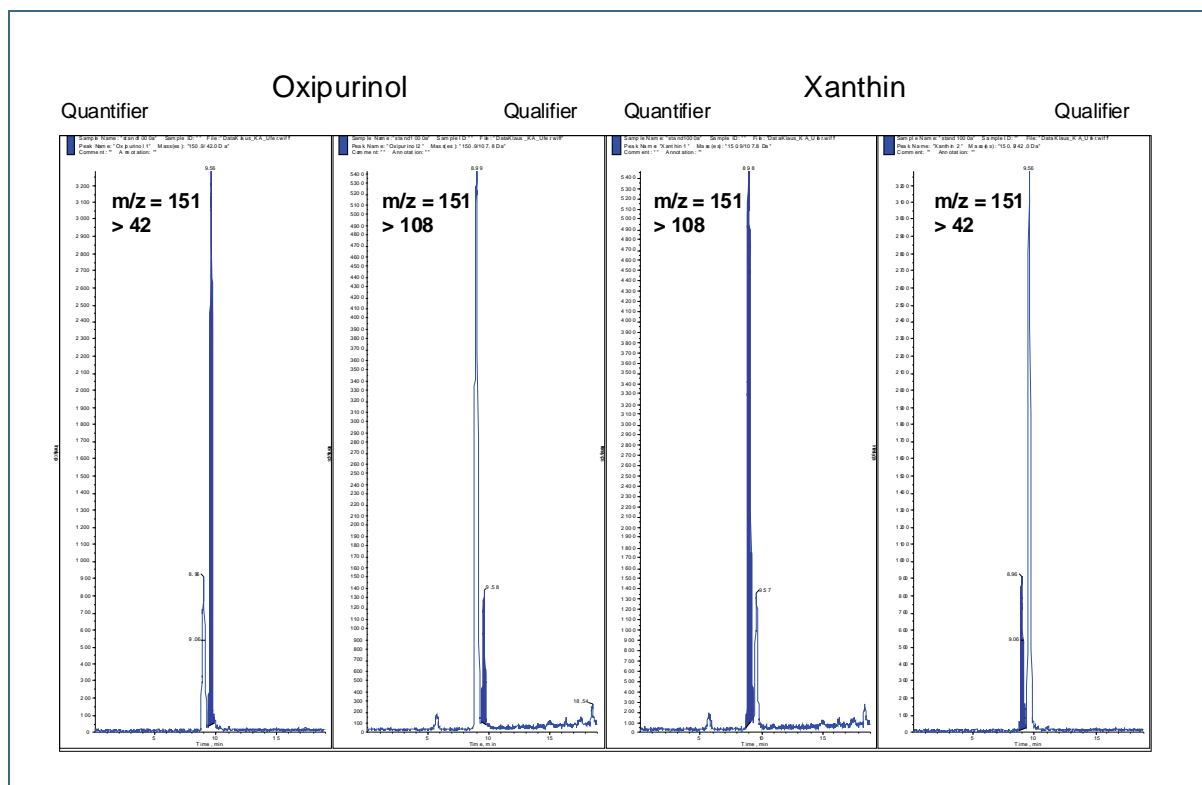


Abb. 3: Trennung von Oxipurinol und Xanthin

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen stellte sich heraus, dass Oxipurinol in realen Wässern nicht stabil ist, sondern weiter metabolisiert wird. Dagegen ist Oxipurinol in wässrigen Standardlösungen, die in entionisiertem Wasser hergestellt werden, stabil. Dies weist auf einen biologischen Abbau von Oxipurinol hin. Es ist daher zwingend erforderlich, Proben möglichst schnell nach der Probenahme zu messen, bzw. – wie für den Abbautest in Laborkläranlagen durchgeführt – sofort einzufrieren und nach dem Wiederauftauen umgehend zu bearbeiten.

Mehrfachmessungen von Uferfiltratproben im Abstand von mehreren Tagen führten neben abnehmenden Massensignalen wiederum zu veränderten Verhältnissen der Tochtermassen. Dies kann nur durch die Anwesenheit mindestens einer weiteren Verbindung erklärt werden, die unter den jetzt gewählten Bedingungen chromatographisch nicht von Oxipurinol abtrennbar ist. Eine Identifizierung dieser Störsubstanz/en war bisher nicht möglich.

Während das Auftreten von Oxipurinol in Uferfiltraten qualitativ gemäß Richtlinie 96/23/EG (Europäische Union 2006) bestätigt werden konnte, war eine sichere Quantifizierung dort nicht möglich. Aus diesem Grund sind im Kapitel 3.2.3.2 keine Oxipurinol-Daten angegeben. Da bei den Proben aus dem Abbautest in Laborkläranlagen und im Zahn-Wellenstest die Störsubstanz/en nicht auftraten, konnte hier eine Quantifizierung erfolgen. Dagegen wurde auf die Messung von Oxipurinol in realen Abwässern und Oberflächenwässern verzichtet.

### 3 Ökochemisches Verhalten

#### 3.1 Stoffdaten der ausgewählten Substanzen

##### 3.1.1 Carbamazepin

##### Anwendung und Eintrag in die Umwelt

Carbamazepin (CBZ) ist das am meisten verordnete Antiepileptikum in Deutschland. Im Jahr 2001 entfielen ca. 40 % der verordneten Tagesdosen aller Antiepileptika auf Carbamazepin; insgesamt betrug die Verbrauchsmenge 87 t/a in Deutschland.

In der Literatur sind 39 humane Metaboliten von Carbamazepin beschrieben (Miao et al., 2005). In der Leber wird der Wirkstoff überwiegend zum pharmakologisch aktiven Epoxid oxidiert, welches dann zu inaktiven Verbindungen, hauptsächlich zu Dihydroxy-Derivaten und Glucuroniden metabolisiert wird (Abb. 4).

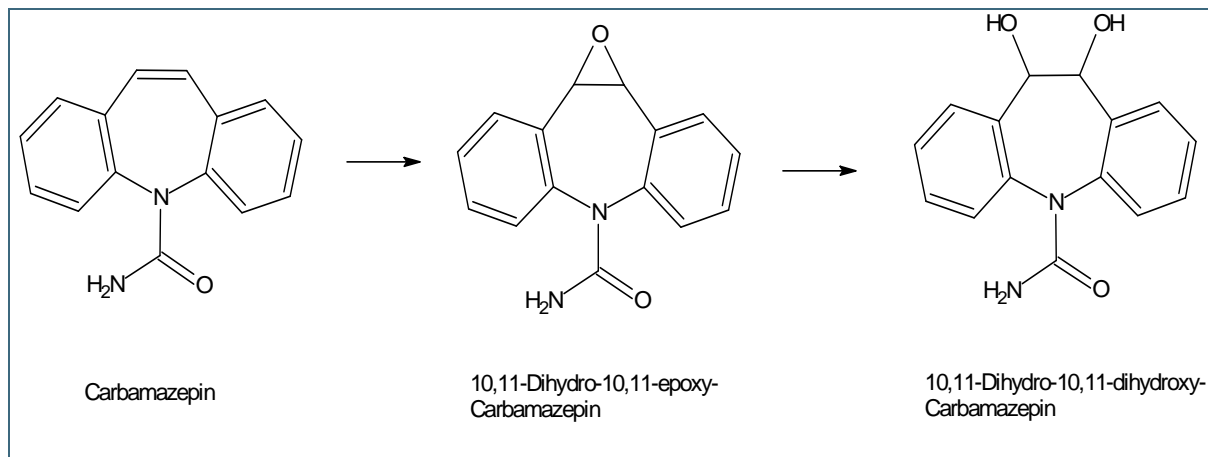


Abb. 4: Humaner Metabolismus von Carbamazepin

In geringerem Umfang wird die Transformation zu 2- oder 3-Hydroxycarbamazepin sowie die Oxidation zum 10,11-Dihydro-10-Hydroxycarbamazepin beobachtet (Miao et al., 2005).

In der Pharmakokinetik wird die Bioverfügbarkeit von Carbamazepin mit 70 bis 80 % angegeben. Dies bedeutet, dass 70 bis 80 % des Pharmakons unverändert oder als Metabolit aus seiner Arzneiform freigesetzt, resorbiert und letztendlich am Wirkort verfügbar werden. Der Rest von 20 bis 30 % wird unverändert mit den Fäzes ausgeschieden, nur 2 bis 3 % können unverändert im Urin detektiert werden (Mersmann, 2003). Bernus et al. (1995) untersuchten den humanen Metabolismus von Carbamazepin bei Schwangeren und detektierten im Urin von der eingesetzten Menge 0,5 % als unveränderten Wirkstoff Carbamazepin (CBZ), 2,1 % als 10,11-Dihydro-10,11-Epoxy-Carbamazepin (CBZ-Epoxid), 34,6 % als 10,11-Dihydro-10,11-dihydroxycarbamazepin (CBZ-DiOH), 2,3 % als 2-Hydroxycarbamazepin (CBZ-2OH) und 3,7 % als 3-Hydroxycarbamazepin (CBZ-3OH).

Wie andere Humanpharmaka auch gelangen Carbamazepin und dessen humane Metaboliten nach der Anwendung über kommunale Kläranlagen punktuell in das aquatische System. Während Carbamazepin regelmäßig im Zu- und Ablauf von deutschen Kläranlagen mit typischen Konzentrationen von 1-2 µg/l gemessen wird (Ternes, 1998; Heberer et al., 2002; Ternes et al., 2003; LfW, 2004a; Zuehlke et al., 2004; Feldmann, 2005; Düring et al., 2006; LfU, 2008), existieren zu den Metaboliten nur wenige Messwerte. Sie sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: Konzentration von Carbamazepin und den humanen Metaboliten im Kläranlagenzu- und ablauf in ng/l (24h-Mischprobe, nicht korrespondierend, aus Miao et al., 2005)

Probe	CBZ [ng/l]	CBZ-DiOH [ng/l]	CBZ-Epoxid [ng/l]	CBZ-2OH [ng/l]	CBZ-3OH [ng/l]	CBZ-10OH [ng/l]
Zulauf	356	1001	39	59	55	22
Ablauf	251	1081	19	70	69	33

Im Zu- und Ablauf der Kläranlage wurden alle aufgeführten Metaboliten nachgewiesen. Neben der Wirksubstanz CBZ fällt besonders das Diol mit einer 2-4fach höheren Konzentration auf, welches auch in weiteren Kläranlagenzu- und -abläufen nachgewiesen wurde (Miao und Metcalfe 2003; Hummel et al., 2006; LfU, 2009).

Mit Ausnahme des Epoxids (Miao et al., 2005; Gómez et al., 2007) wurde kein Abbau der Metaboliten beobachtet. Oft ist sogar eine leichte Erhöhung der Konzentration im Klärverlauf zu erkennen, was auf eine mögliche Dekonjugation von glucuronierten Metaboliten zurückgeführt wird (Miao et al., 2005; Kosjek et al., 2007). Carbamazepin selbst wird zu ca. 30 % eliminiert, was mit einer Sorption am Schlamm – im Wesentlichen in der Vorklärung – erklärt wird. In Übereinstimmung damit wurden im Rohschlamm Carbamazepin-Konzentrationen von ca. 70 µg/kg Trockengewicht gemessen. Die Metaboliten sind im Gegensatz zur Muttersubstanz deutlich polarer (z.B. log K<sub>OW</sub> CBZ-DiOH = 0,13 im Vergleich zu log K<sub>OW</sub> CBZ = 2,7) und sorbieren kaum am Schlamm. Dementsprechend liegen die Konzentrationen im Schlamm – wenn überhaupt nachweisbar – im einstelligen µg/kg-Bereich (Miao et al., 2005).

### Verteilung und Verbleib in Oberflächengewässern

Carbamazepin wird in deutschen Oberflächengewässern regelmäßig nachgewiesen. Im Mittel liegen die Konzentrationen um 0,1 µg/l, maximal bei 3 µg/l (Sacher et al., 1998; Ternes, 1998; LfW, 2004a; Weigel et al., 2004; Wiegel et al., 2004; Zuehlke et al., 2004; LfU, 2008). Dagegen liegen nur wenige Messwerte von Metaboliten in Oberflächengewässern vor. Sie sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3: Carbamazepin und dessen Metaboliten in deutschen Oberflächengewässern

Anzahl Proben	CBZ [ng/l]	CBZ-DiOH [ng/l]	CBZ-Epoxid [ng/l]	Literatur
1	0,7	2,2	n.b.	Miao und Metcalfe, 2003
3	25	58	n.b.	Hummel et al., 2006
118/15	10-500	n.b.	n.n.-100	LfW, 2004a
62	16-150	30-280	n.b.	LfU, 2009

Bislang wurde nur das CBZ-DiOH nachgewiesen, wobei es auch im Oberflächengewässer in deutlich höherer Konzentration als die Muttersubstanz Carbamazepin vorliegt.

Der photolytische Abbau gilt im Oberflächengewässer als Hauptsenke von Carbamazepin. Dabei beträgt die Quantenausbeute der direkten Photolyse durch Sonnenlicht  $4,77 \times 10^{-5}$ , was einer abgeschätzten Halbwertszeit im Gewässer von ca. 100 Tagen (Sommer) bzw. ca. 450 Tagen (Winter) ent-

spricht (Andreozzi et al., 2003). Übereinstimmend ermittelten die Autoren in einer früheren Studie eine Halbwertszeit von 122 Tagen in Oberflächengewässern (Andreozzi et al., 2002), während in einer neueren Studie eine etwas höhere Quantenausbeute von  $1,3 \times 10^{-4}$  ermittelt wurde (Lam und Mabury, 2005). Die Geschwindigkeit des hydrolytischen Abbaus (LfU, 2008) und die Sorption am Sediment (Stein et al., 2007) sind dagegen sehr gering.

Auch von CBZ-DiOH wurde im Wasser-Sediment-System nur eine geringe Sorptionsneigung festgestellt (Stein et al., 2007). Weitere Daten über das Verhalten und die Persistenz der Metaboliten in Oberflächengewässern liegen nicht vor.

### Toxikologische Untersuchungen

Nach den bisherigen Untersuchungen ist die akute Toxizität von Carbamazepin gegenüber Wasserlebewesen mit  $EC_{50}$ -Werten im mg/l-Bereich gering (Andreozzi et al., 2002; Ferrari et al., 2003). Bei chronischer Einwirkung können die Wirkkonzentrationen jedoch viel geringer sein, wie Ferrari et al. (2003) durch Messungen an *Ceriodaphnia dubia* (Crustaceen) mit einer NOEC von 25 µg/l verdeutlichen. Auf der Basis von recherchierten Toxizitätsdaten im aquatischen Bereich (Anhang 4) ergibt eine vorläufige Umweltrisikobewertung einen PNEC-Vorschlag („predicted no effect concentration“) von 4,5 µg/l. In der Literatur werden PNECs im Bereich von 0,5 µg/l bis 17 µg/l genannt (LUA BRB, 2002; BLAC, 2003; LAWA, 2005).

Oetken und Koautoren wiesen zudem 2005 eine spezifische Beeinflussung der Entwicklung von Zuckmücken (*Chironomus riparius*) durch Carbamazepin im Sediment nach. Zuckmücken machen einen erheblichen Anteil der Biomasse in mitteleuropäischen Oberflächengewässern aus und können eine wichtige Rolle als Fischnährtiere spielen. Carbamazepin blockiert die Verpuppung der Mücken ab einem Schwellenwert von 113 µg/kg Trockensubstanz im Sediment. Auf der Basis dieser Ergebnisse ergab eine vorläufige Umweltrisikobewertung einen PNEC von 2,7 µg/kg TS. Daraus wurde für benthische Organismen ein mögliches Risiko abgeleitet, da die im Sediment gemessenen Konzentrationen diesen Wert um das 15-fache übersteigen (Oehlmann et al., 2006).

Hinsichtlich der Ökotoxizität der humanen Metaboliten liegen nur wenige Daten vor. Mittels QSAR wurde abgeschätzt, dass entgegen dem Trend, Metaboliten seien weniger toxisch als die Muttersubstanz, humane Metaboliten von Carbamazepin (v.a. das Iminostilben) toxischer sind (Lienert et al., 2007). Das Iminostilben wird für Überreaktionen bei der CBZ-Einnahme beim Menschen verantwortlich gemacht. Zudem wurden fetale Missbildungen bei Mäusen auf das CBZ-10,11-Epoxid und seine weiteren Abbauprodukte zurückgeführt (aus Celiz et al., 2009).

### 3.1.2 Sulfamethoxazol

#### Anwendung und Eintrag in die Umwelt

Sulfamethoxazol (SMX) ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Sulfonamide. Der Wirkmechanismus beruht auf einer Störung des Folsäurestoffwechsels in den Zielbakterien, indem das Sulfonamid die p-Aminobenzoessäure bei der Folsäureproduktion kompetitiv verdrängt. Da die Bakterien durch den Folsäuremangel nicht absterben, sondern nur in ihrer Vermehrung gehemmt werden, ist der Wirkmechanismus dieser Medikamentengruppe bakteriostatisch. In 2001 wurden in Deutschland 53 t SMX verbraucht (LANUV, 2007).

SMX gelangt über die natürlichen Ausscheidungen wie Urin und Fäzes in das Abwassersystem. Pharmakokinetische Studien zeigen, dass SMX überwiegend renal und nur zu < 1 % über die Fäzes ausgeschieden wird (Feldmann, 2005). Allerdings wird SMX nur zu ca. 14-20 % als aktiver Wirkstoff ausgeschieden, da es im menschlichen Körper weitgehend metabolisiert wird. Hauptmetaboliten sind



N<sup>4</sup>-Acetylsulfamethoxazol (Ac-SMX) mit einer Ausscheidungsrate von ca. 44-60 % (bezogen auf das verabreichte SMX) und N<sup>1</sup>-Sulfamethoxazol-Glucuronid mit einer Ausscheidungsrate von 10-15 % im Urin (Vree et al., 1995; Feldmann, 2005). Der humane Metabolismus von SMX ist in Abb. 5 dargestellt.

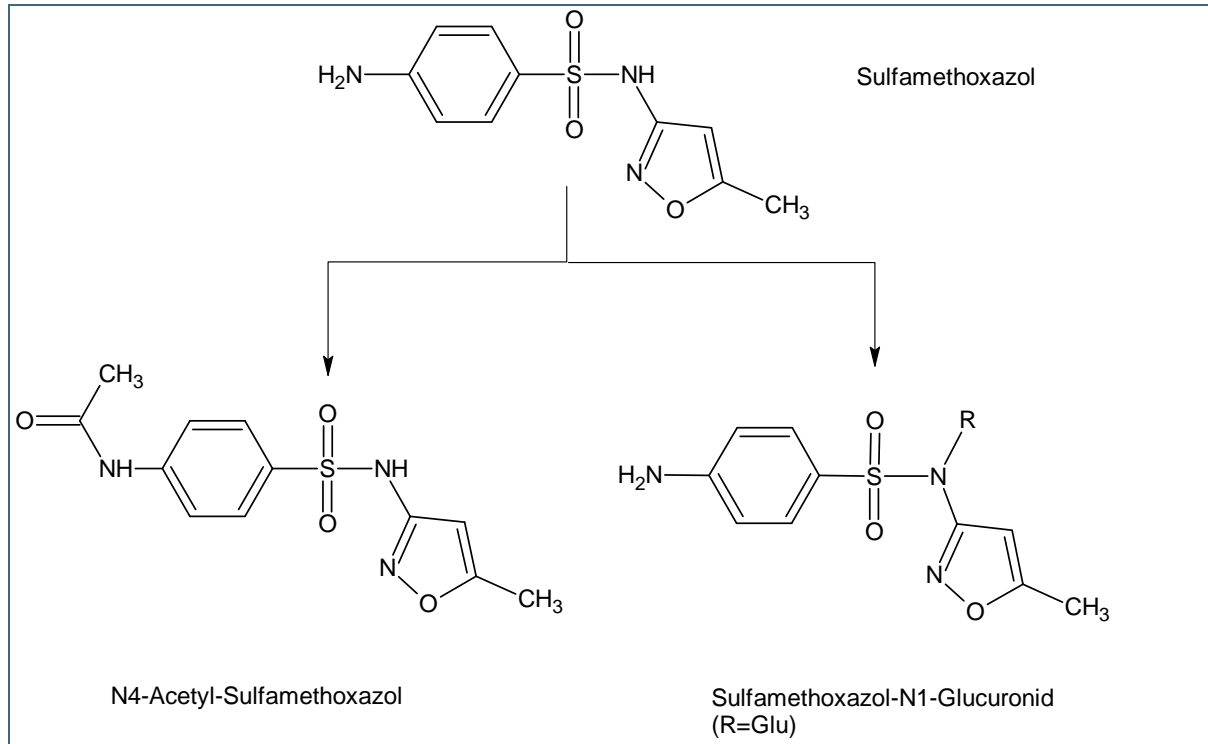


Abb. 5: Humaner Hauptmetabolismus von Sulfamethoxazol (SMX)

Die Konzentrationen von SMX in deutschen Kläranlagenabläufen liegen meist im Bereich von 0,2-1,1 µg/l (Hirsch et al., 1999; Heberer 2002a; Ternes et al., 2003; LfW, 2004a; Feldmann, 2005; LfU, 2008; LfU, 2009). Auch der Hauptmetabolit Ac-SMX wird häufig nachgewiesen. Die ermittelten Konzentrationen liegen meist nahe der Nachweisgrenze, maximal aber bis 2,2 µg/l (Hilton und Thomas, 2003; Ashton et al., 2004; Göbel et al., 2004; LfU, 2008; LfU, 2009).

Die Elimination von SMX im Klärprozess wurde häufig durch Vergleich der Zu- und Ablaufkonzentrationen in beprobten Kläranlagen abgeschätzt (Carballa et al., 2004; Brown et al., 2005; Karthikeyan und Meyer, 2006). Allerdings sind solche Daten oft nur als Hinweise einzustufen, da meist keine korrespondierenden Proben gezogen und keine Massenbilanzen aufgestellt wurden sowie selten eine ausreichende Statistik vorliegt.

Gerade bei der Untersuchung von SMX kommt noch hinzu, dass der in realen Abwässern auftretende humane Metabolit Ac-SMX meist nicht in die Untersuchung einbezogen wurde. Göbel und Koautoren stellten jedoch 2005 fest, dass 75 % der gesamten SMX-Zulaufmenge als Ac-SMX vorliegen. Weiter wird angenommen, dass Ac-SMX während der Kläranlagenpassage in SMX retransformiert wird. Bei einem so hohen Anteil an (wahrscheinlich) retransformierbaren Metaboliten können aus Eliminationsstudien an realen Kläranlagen, die den wesentlichen Metaboliten nicht betrachten, keine verlässlichen Aussagen getätigt werden. Ohne Berücksichtigung von Ac-SMX schwankt folglich die Einschätzung der Elimination von SMX im Bereich von 18 bis 100 % (Carballa et al., 2004; Brown et al., 2005; Karthikeyan und Meyer, 2006). Deshalb werden im Folgenden nur Studien ausgewertet, die entweder den Metaboliten berücksichtigen oder als Laborexperimente ausschließlich mit SMX durchgeführt wurden.

Eine der wenigen Studien, die auch Ac-SMX berücksichtigen, wurde von Göbel und Koautoren veröffentlicht. Die Elimination von SMX + Ac-SMX beträgt während des gesamten Klärprozesses 60 % (Belebtschlammverfahren) bis 80 % (Membranbioreaktor), wobei der größte Teil in der Belebungsstufe eliminiert wird (Göbel et al., 2005; Göbel et al., 2007). Hätte man nur SMX betrachtet, wäre keine Elimination erkennbar gewesen (Joss et al., 2005). Die auf Einwohnerwerte (EW) bezogenen Frachten betragen in Abhängigkeit der untersuchten Kläranlage und Probennahmezeitpunkt 0,04-0,2 mg/(EW×d) für SMX und 0,26 – 0,58 mg/(EW×d) für Ac-SMX (Göbel et al., 2005; Lindberg et al., 2005).

In Laborexperimenten wurde durch Untersuchungen in einem Sequencing Batch Reactor<sup>1</sup> festgestellt, dass SMX nach einer Adaptionszeit von wenigen Tagen vollständig und schnell von Belebtschlamm eliminiert wird. Andererseits findet bei Anwesenheit von leicht verwertbaren C- und N-Quellen mit adaptierten Mikroorganismen kein Abbau von SMX statt (Drillia et al., 2005a). Perez und Koautoren nutzten reales, mit Sulfamethoxazol dotiertes Abwasser aus verschiedenen Stufen einer kommunalen Kläranlage für Abbaustudien im Batch-Format (Perez et al., 2005). In den Abläufen des Belebungsbeckens und der nachgeschalteten Denitrifikationsstufe fand ein schneller Abbau statt, der innerhalb von ca. 10 Tagen zu einer deutlichen Minderung der SMX-Konzentration führte. Dagegen wurde im Ablauf der Vorklärung eine lag-Phase von 2 Wochen benötigt, bevor ein exponentieller Abbau beobachtet werden konnte. Im Ablauf der Nachklärung fand kein signifikanter Abbau statt.

Fasst man die Ergebnisse dieser Studien zusammen, so lässt sich folgern, dass SMX biologisch gut abgebaut wird. Eine Quantifizierung des Abbaus konnte mithilfe von Laborkläranlagen durchgeführt werden, da hier im Gegensatz zu realen Anlagen eine separierte Betrachtung von SMX möglich war. Bei einer umweltrelevanten Dosierung von 1 µg/l SMX im Zulauf wurde eine Elimination in Höhe von 84 % beim Durchlaufen der Laborkläranlagen nachgewiesen (LfU, 2008).

### Verteilung und Verbleib in Oberflächengewässern

In Oberflächengewässern liegen die gemessenen Konzentrationen von SMX meist im Bereich von 10-150 ng/l (Hirsch et al., 1999; Brauch et al., 2002; LfW, 2004a; Wiegel et al., 2004; LfU, 2008; LfU, 2009) mit Spitzenwerten bis 1,9 µg/l (Kolpin et al., 2002; Brown et al., 2005). Messwerte von Ac-SMX liegen kaum vor. In der Schweiz wurde im Oberflächengewässer eine mittlere Ac-SMX-Konzentration von 4,2 ng/l bei einer mittleren SMX-Konzentration von 23,4 ng/l nachgewiesen (AWEL, 2005). In bayerischen Oberflächengewässern finden sich typische Konzentrationen von <5-70 ng/l Ac-SMX (LfU, 2009).

Aus der rasch abnehmenden SMX-Konzentration im Vorfluter mit zunehmender Entfernung zur Einleitung der Kläranlage folgern Yang und Carlson (2003), dass SMX im Oberflächengewässer rasch eliminiert wird. Diese Elimination kann entweder auf biologischen Abbau (s. oben), auf Sorption oder auf abiotischen Abbau zurückgeführt werden. Die von Lam und Mabury (2005) in reinem Wasser ermittelten Halbwertszeiten der direkten Photolyse von ca. 1,5 h sprechen für einen schnellen Photoabbau, der allerdings durch die Anwesenheit von natürlichen Wasserinhaltsstoffen wie organischem Material und Nitrat verlangsamt wird. In Mikrokosmosstudien wurde ebenfalls die Photolyse als Hauptabbauweg im Gewässer identifiziert (Lam et al., 2004). Die Geschwindigkeit des hydrolytischen Abbaus (LfU, 2008) und die Sorption am Sediment (Stein et al., 2007) sind dagegen sehr gering. Auch für Ac-SMX wurde im Wasser-Sediment-System nur eine geringe Sorptionsneigung festgestellt (Stein et al., 2007). Weitere Daten über das Verhalten und die Persistenz der Metaboliten in Oberflächengewässern liegen nicht vor.

<sup>1</sup> Der Sequencing Batch Reactor ist eine Variante des Belebtschlammverfahrens, bei dem die Verfahrensschritte nicht entlang einer Wegachse, wie es z. B. bei kaskadenförmig durchströmten Belebungsanlagen üblich ist, sondern entlang einer Zeitachse geführt werden.

Im Grundwasser wird SMX häufig nachgewiesen. In bayerischen Grundwasserproben wurden Konzentrationen bis 66 ng/l, in baden-württembergischen sogar bis 410 ng/l nachgewiesen (Sacher et al., 2001; Sacher et al., 2002; Mückter et al., 2004). In umfassenden Studien kommen sowohl Hirsch und Koautoren (1999) als auch das schweizerische Amt für Abfall, Wasser, Energie und Luft (AWEL, 2005) zu dem Schluss, dass die SMX-Funde im Grundwasser auf die Infiltration von Oberflächenwasser oder Abwasser zurückzuführen sind. Dieses Ergebnis deckt sich mit Erfahrungen aus Bayern, wo SMX vor allem in Fassungen nachgewiesen wurde, die unter Uferfiltrateinfluss stehen (LfW, 2004a; Mückter et al., 2004).

Das Technologiezentrum Wasser in Karlsruhe ist der Frage nachgegangen, inwieweit SMX während der Uferfiltration eliminiert werden kann. Der Vergleich zweier Standorte führte zu dem Ergebnis, dass der Abbau von SMX während der Untergrundpassage im Wesentlichen von den Redoxverhältnissen abhängt. Während der anaeroben Uferfiltration wurde SMX schon im ersten Beobachtungsbrunnen vollständig eliminiert, während unter der aeroben Uferfiltration kein oder nur ein geringer Abbau erreicht wurde (Schmidt et al., 2003). Weitere Bodeneigenschaften wie z. B. Porosität, pH-Wert oder organischer Gehalt des Bodens scheinen eine untergeordnete Rolle im Rückhalt von SMX zu spielen, da die Sorption von SMX am Boden auch unter variierenden Bedingungen als gering eingestuft wird (Drillia et al., 2005b; Gao und Pedersen, 2005).

### Toxikologische Untersuchungen

Ökotoxikologische Studien liegen bislang nur von der Wirksubstanz SMX vor. Von den Metaboliten sind keine Studien bekannt.

In den akuten Tests (Bakterium, Alge, Crustaceen und Fisch) lagen die Toxizitäten von SMX im Bereich von 10 – 30 mg/l (Isidori et al., 2005). Länger währende Exposition führt jedoch zu Wirkkonzentrationen im höheren µg/l-Bereich, während aus chronischen Tests wie dem Phototoxizitätstest an der Wasserlinse *L. gibba* ein LOEC-Wert von 30 µg/l resultiert (Brain et al., 2004). Zudem wurde eine mutagene Aktivität von SMX im Ames-Test nachgewiesen (Isidori et al., 2005). Auf der Basis von recherchierten Toxizitätsdaten (Anhang 4) ergibt eine vorläufige Umweltrisikobewertung einen PNEC-Vorschlag („predicted no effect concentration“) von 0,3 µg/l. In der Literatur werden Umweltqualitätsnorm-Vorschläge bzw. PNEC-Werte von 0,15 µg/l (LAWA, 2005) und 3,3 µg/l (Knacker, 2003) genannt.

### 3.1.3 Primidon

#### Anwendung und Eintrag in die Umwelt

Primidon ist ein krampflösender Arzneistoff aus der Gruppe der Antikonvulsiva, der zur Dauerbehandlung bestimmter Formen von Epilepsie eingesetzt wird. Es wird unter den Handelsnamen Liskantin®, Mylepsinum®, Primidon Holsten® und unter generischer Bezeichnung angeboten.

An der antikonvulsiven Wirkung sind neben Primidon auch dessen pharmakologisch wirksame Metaboliten Phenobarbital und 2-Phenyl-2-ethylmalonamid (PEMA) beteiligt (Abb. 6). Die Tagesdosis beträgt 750 bis 1000 mg (Kommentar zum Europäischen Arzneibuch, 2005), der Gesamtverbrauch in der BRD betrug 2001 9 Tonnen (LANUV, 2007).

In der Leber wird Primidon teilweise zu Phenobarbital und PEMA biotransformiert. Die Ausscheidung erfolgt überwiegend über die Niere (76-92 % der applizierten Dosis). Etwa 42 % der Dosis werden als unveränderter Wirkstoff im Urin wiedergefunden, 5 % als Phenobarbital und 45 % in Form von PEMA (Fachinformation Holsten Pharma GmbH).

Die molare Masse von Primidon beträgt 218,16 g/mol. Es ist im Wasser schwer löslich (500 mg/l bei 25°C, Hazardous Substances Data Bank), der Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient  $K_{ow}$  liegt bei einem Wert von 8 (Hanisch et al., 2002).

Primidon wird regelmäßig in den Zu- und Abläufen deutscher Kläranlagen gemessen. In LfU (2009) wurden in Kläranlagenabläufen Werte von 70-550 ng/l ermittelt. Metzger et al. (2004) kam bei 24 untersuchten Kläranlagenabläufen auf einen Medianwert von 227 ng/l. PEMA wurde bislang nur in bayrischen Kläranlagenabläufen gemessen. Die höchsten Konzentrationen lagen bei 230 ng/l (LfU, 2009).

Die Literaturangaben zur Elimination von Primidon in Kläranlagen sind nicht eindeutig. Metzger et al. (2004) und Schneider (2004) errechneten an sechs Kläranlagen eine mittlere Elimination von 40 % mit einer Streuung von 0 bis 99 %. Nach Kahle et al. (2009) ist die Elimination von Primidon in Kläranlagen vernachlässigbar.

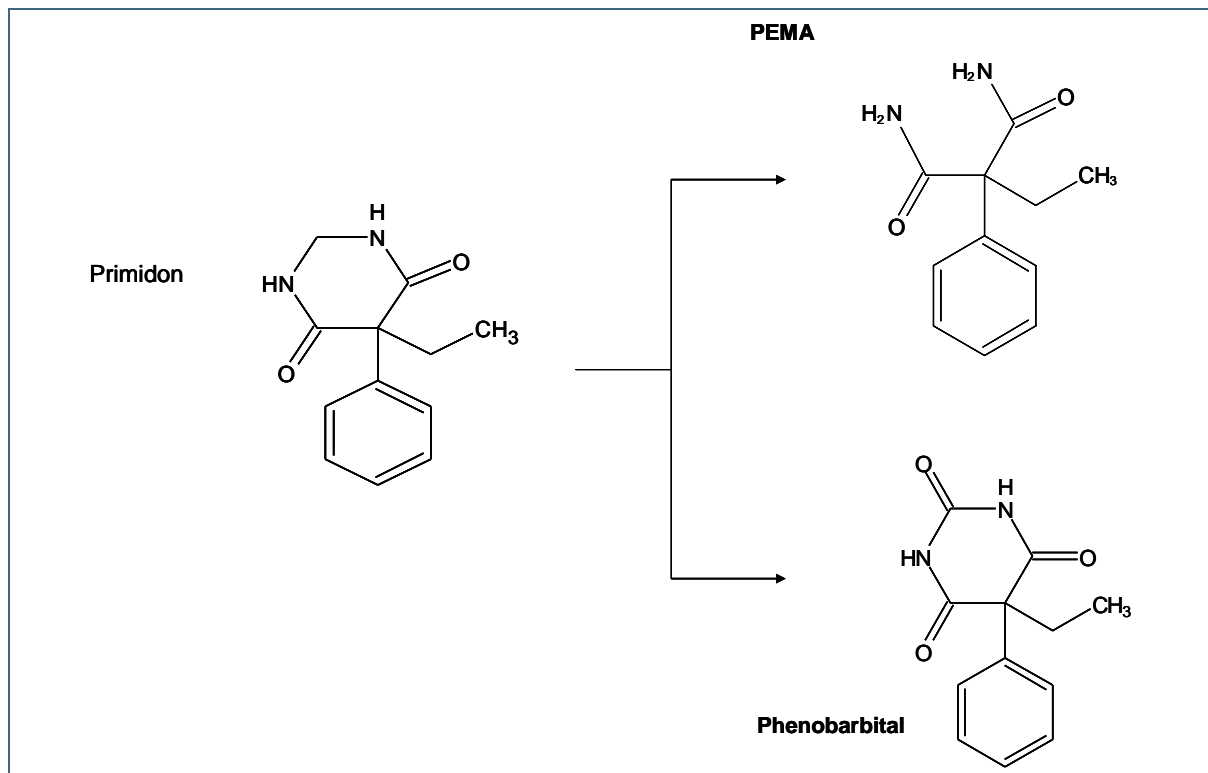


Abb. 6: Humaner Metabolismus von Primidon (5-Ethyl-5-phenylhexahydropyrimidin-4,6-dion, CAS: 125-33-7)

### Verteilung und Verbleib in Oberflächengewässern und Grundwässern

Primidon wurde in deutschen Oberflächengewässern im Konzentrationsbereich von 10-635 ng/l gefunden (Heberer et al., 2002; Reddersen 2004; LfW, 2004a). Der Metabolit PEMA wies an der Donau Konzentrationen von 7-16 ng/l und an der Würm von 12-30 ng/l auf (LfW, 2004a).

Studien zum Verhalten von Primidon während der Uferfiltration und der Grundwasseranreicherung zeigen, dass Primidon nicht wesentlich zurückgehalten wird (Drewes et al., 2003; Heberer et al., 2004; Kahle et al., 2009). So wurde Primidon in den flachen Grundwassermessstellen und im Wasserwerksbrunnen einer Transsekte in Berlin in Konzentrationen zwischen 30 und 170 ng/l nachgewiesen (Heberer und Adam, 2004; Reddersen, 2004). Massmann et al. (2007) fanden Primidon im Berliner Uferfiltrat in Konzentrationen bis zu 480 ng/l. In den Reinwässern der Berliner Wasserwerke wurde Primidon in 99 % der von Dezember 2000 bis Juni 2002 gezogenen Proben (n=71) mit Konzentrationen von n.n. bis 120 ng/L nachgewiesen (Reddersen, 2004).

## Toxikologische Untersuchungen

Während die Mutagenität von Primidon nicht abschließend beurteilt werden kann, gibt es in der Literatur Hinweise auf reproduktionstoxische Wirkungen auf den (nicht näher bezeichneten) Säugerorganismus (Fachinformation Desitin Arzneimittel GmbH). Inwieweit die für den Menschen bzw. die Ratte beschriebene Verminderung der Aktivität und Einschränkung des Bewegungsablaufes (Arzneimittelkursbuch, 1999/2000; RTECS-Datenbank, 2001) auch für aquatische Organismen bei den dort ermittelten Expositionskonzentrationen von Primidon wirksam wird und so z.B. zu einer Beeinflussung des Räuber-Beute-Verhältnisses führt, kann derzeit nicht beantwortet werden. Die akute Fischtoxizität wird für Primidon mit einem LC50 von 3,2 mg/l angegeben (LANUV, 2007). Infolge des Humanmetabolismus gelangen bei der Gabe von Primidon mit Phenobarbital und Phenylethylmalonamid zwei pharmakologisch aktive Metaboliten in die Umwelt, zu deren Ökotoxizität noch keine Daten vorliegen.

### 3.1.4 Ritalinsäure

Ritalin (Methylphenidat) wird vor allem zur Behandlung der Aufmerksamkeitsdefizit/Hyperaktivitätsstörung (AD/HS) verschrieben. Es wirkt im Hirn nicht wie ein Beruhigungsmittel, sondern – umgekehrt – es bewirkt, dass der Botenstoff Dopamin länger zwischen den Nervenzellen bleibt, so dass Wahrnehmungen und Empfindungen besser gefiltert und bewertet werden können und die Aufmerksamkeit steigt. Insgesamt ist festzustellen, dass das Verordnungsvolumen von Methylphenidat im letzten Jahrzehnt kontinuierlich zugenommen hat; es hat sich von etwa 2 Mio. definierten Tagesdosen im Jahre 1995 auf rund 20 Mio. definierter Tagesdosen im Jahre 2003 verzehnfacht (Bundesärztekammer, 2005; Gieseke, 2009). Nach den Angaben des Jahresberichts des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte von 1997 stieg der Verbrauch an Methylphenidat von 34 kg im Jahr 1993 auf 119 kg im Jahr 1997 (Ferber et al., 2001). Nach Kortmann (2008) wurden in Deutschland im Jahr 2006 bereits 1,2 Tonnen Ritalin verschrieben.

Ritalin wird im menschlichen Körper schnell und nahezu vollständig (99 %) metabolisiert. Es wird vornehmlich zu Ritalinsäure ( $\alpha$ -Phenyl-D-Piperidinessigsäure) abgebaut und zu 78-97 % der verabreichten Menge über den Urin ausgeschieden (Abb. 7) (Fachinformation Novartis Pharma). Ritalinsäure ist pharmakologisch gering bzw. nicht mehr wirksam. Für den Metaboliten liegen weder Daten zum Verhalten bei der Abwassereinigung noch zum Auftreten in Gewässern vor. Weiterhin gibt es keine Kenntnisse zur Ökotoxizität.

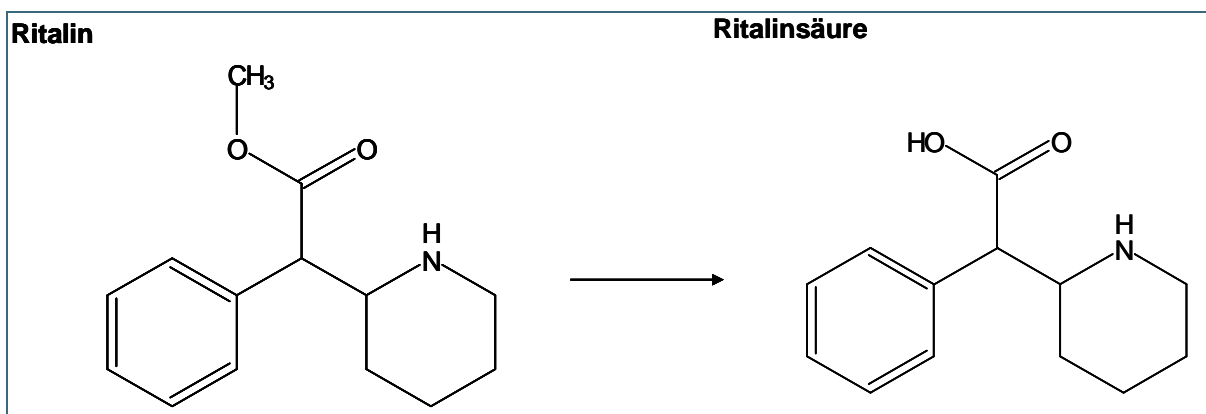


Abb. 7: Humaner Metabolismus von Ritalin (Methylphenidat, CAS: 113-45-1)

## 3.2 Ökochemisches Verhalten der ausgewählten Substanzen

### 3.2.1 Abbauverhalten und Eintrag ins Gewässer

Die Gefährlichkeit von Umweltchemikalien wird im Wesentlichen durch die Eigenschaften Persistenz, Bioakkumulation und Toxizität bestimmt. Dabei wird die Persistenz einer organischen Substanz in der aquatischen Umwelt neben dem biologischen Abbauvermögen noch von abiotischen Prozessen – wie z.B. der Hydrolyse - bestimmt. Der biologische Abbau erfolgt meist in mehreren Stufen. In der ersten Stufe, dem so genannten Primärabbau, wird der Ausgangsstoff strukturell verändert. In den folgenden Stufen werden die beim Primärabbau gebildeten Transformationsprodukte weiter zerlegt, bis beim vollständigen Abbau (Mineralisierung) als letzter Schritt die ganze Substanz zu CO<sub>2</sub>, Wasser, anorganischen Salzen und Biomasse umgewandelt ist. Im Folgenden werden Untersuchungen zur abiotischen und biotischen Abbaubarkeit der untersuchten Arzneimittel-/Metaboliten beschrieben.

#### Hydrolyse

In diesem Projekt wurde die Hydrolyse von Primidon, PEMA, SMX, Ac-SMX sowie Oxipurinol in einem fünftägigen Vortest bei 50 °C nach OECD 111 untersucht. Die Hydrolyse von Carbamazepin war bereits in einem früheren Projekt Teil der Untersuchungen (LfU, 2008). Da die Geschwindigkeit der Hydrolyse pH-abhängig ist, wurden die Untersuchungen in drei verschiedenen auf pH 4, pH 7 und pH 9 gepufferten Lösungen durchgeführt. Die Ionenstärke der Pufferlösung lag im für Oberflächengewässer typischen Bereich von 50 mM. Die Konzentrationen der Substanzen vor und nach der fünftägigen Inkubation ist in Abb. 8 dargestellt.

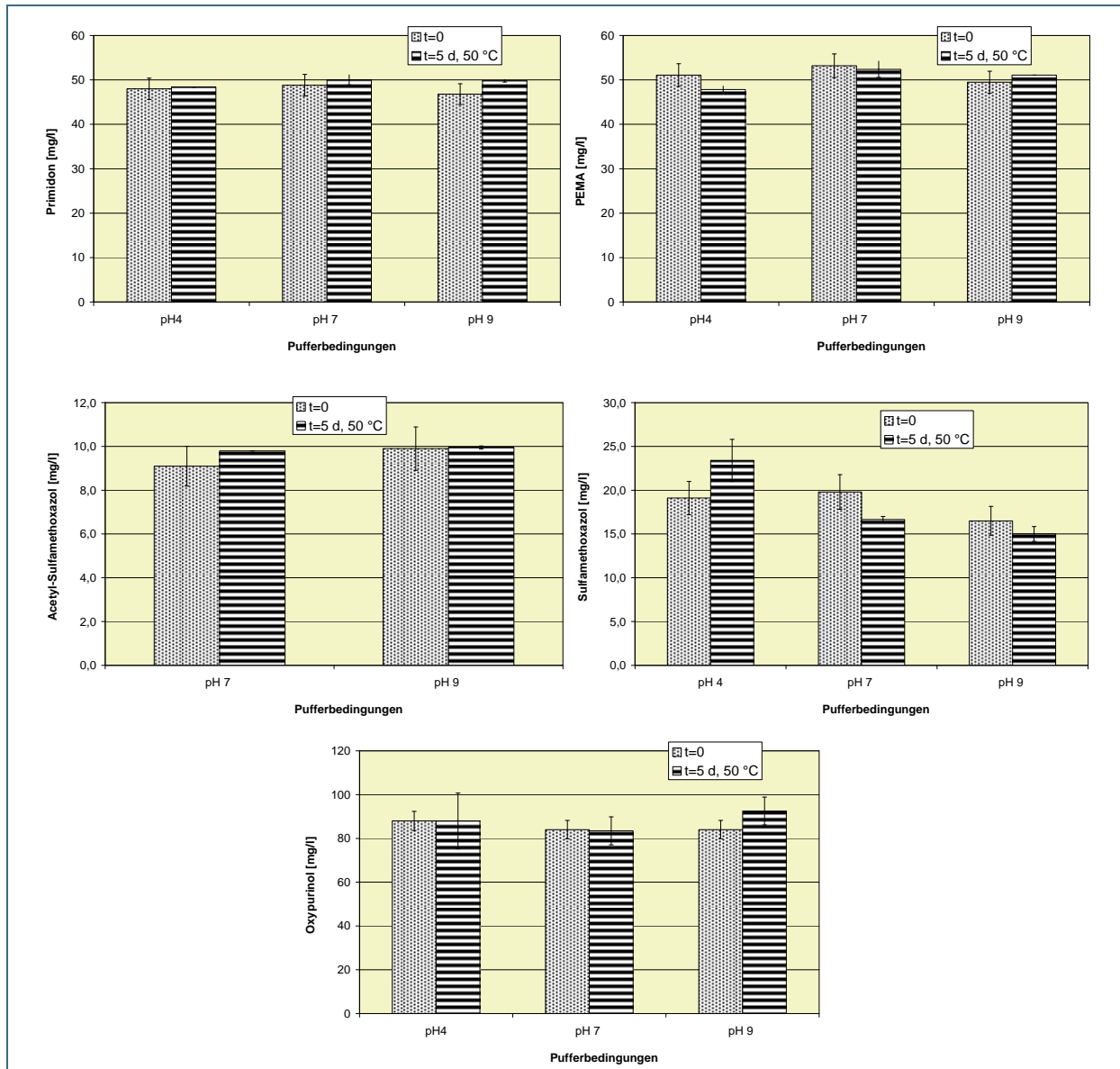


Abb. 8: Primidon- (links oben), PEMA- (rechts oben), Ac-SMX- (Mitte links), SMX- (Mitte rechts) und Oxypurinol-Konzentration bei verschiedenen pH-Werten vor und nach fünftägiger Inkubation bei 50 °C im Thermo-schüttler

Es ist ersichtlich, dass in allen Ansätzen weder die Konzentration der Wirkstoffe noch die der Metaboliten durch die Inkubation signifikant abgenommen hat. Die zusätzlich durchgeführten Messungen des CSB und DOC in den Testansätzen bestätigen diese Aussage. Wenn im Vortest selbst bei 50 °C keine Hydrolyse stattfindet, ist die Substanz generell als hydrolysestabil einzustufen. Weitere Untersuchungen bei ambienter Temperatur sind nicht nötig. Für die nachfolgenden Untersuchungen des biologischen Abbaus bedeutet dies auch praktisch, dass die Lösungen stabil sind.

### Biologischer Abbau

Die Kenntnis der biologischen Abbaubarkeit ist ein zentrales Kriterium für die Bewertung der Umweltrelevanz von Substanzen und Stoffgemischen. Mit biologischen Abbautests kann festgestellt werden, ob mögliche ökotoxische oder mutagene Eigenschaften der Prüfsubstanz in der Umwelt persistieren und damit auch langfristig ein Risikopotenzial darstellen.

Bei der Konzeption von biologischen Abbautests ist in Bezug auf die Prüfsubstanz vor allem deren Konzentration ein wesentlicher Einflussfaktor. Je nach Konzentration des Spurenstoffs unterscheidet man beim biologischen Abbau zwischen

- Substratwachstum, Katabolismus (Konzentrationen eher im mg/l-Bereich):  
Die Bakterien verwenden die organische Substanz als Kohlenstoff- und Energiequelle und mineralisieren sie dabei häufig vollständig.
- Co-Metabolismus (Konzentrationen eher im niedrigen µg/l-Bereich):  
Die Bakterien transformieren einen Spurenstoff, der nicht für das Zellwachstum notwendig ist, wobei ein zusätzliches, primäres Substrat für das Zellwachstum zur Verfügung stehen muss. Durch Co-Metabolismus werden die Spurenstoffe häufig nicht vollständig mineralisiert.

Bei Testmethoden zur Bestimmung der leichten oder potenziellen biologischen Abbaubarkeit steht die Untersuchung der Mineralisation in Vordergrund. In diesen Standardtestverfahren liegt die Prüfsubstanz im mg/l-Bereich als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle vor. Die Mineralisation lässt sich über die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs oder die Zunahme des CO<sub>2</sub> sowie über die Abnahme von Summenparametern wie CSB oder DOC messen. Da diese Testmethoden zur Gewährleistung des Katabolismus und zur Messbarkeit der Mineralisierung Konzentrationen im mg/l-Bereich erfordern, ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Abbau der Substanzen in Kläranlagen oder im Gewässer, bei denen die Substanzen maximal im µg/l-Maßstab vorliegen, nicht zwingend gewährleistet.

Um die Verhältnisse in der Umwelt besser zu simulieren, eignen sich Untersuchungen wie der Belebtschlammsimulationstest (Laborkläranlagen) oder der Wasser-Sedimenttest. Hier kann der organische Spurenstoff in umweltrelevanten Konzentrationen, also im ng/l- bis µg/l-Bereich eingesetzt werden. Der Primärabbau wird über spezifische Analytik erfasst. Allerdings lassen diese Untersuchungen ohne Markierung keine Aussage über die Mineralisierung zu, da die erforderlichen Nachweisgrenzen zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs (CSB bzw. BSB) oder des DOC weit unterschritten werden.

Um die biologische Abbaubarkeit einer Substanz umfassend zu charakterisieren und das Gefährdungspotenzial auch hinsichtlich möglicher Metaboliten einschätzen zu können, müssen sowohl die Mineralisierung als auch der Primärabbau bei umweltrelevanten Konzentrationen in den verschiedenen Umweltkompartimenten betrachtet werden. Deshalb wurden im Rahmen des Projekts folgende Abbautests durchgeführt:

- Testverfahren zur Bestimmung der leichten und potenziellen biologischen Abbaubarkeit
- Belebtschlammsimulationstest (Laborkläranlagen)
- Wasser-Sedimenttest.

Die „leichte“ biologische Abbaubarkeit der Substanzen wurde über die Messung des Sauerstoffbedarfs in einem geschlossenen Respirometer (DEV, 2000, L22) bestimmt. Neben der eigentlichen Untersuchung der Elimination der Prüfsubstanzen wurden noch drei Kontrollproben angesetzt. Um aus der gemessenen Elimination der Prüfsubstanz (biologischer und abiotischer Abbau) auf den biologischen Abbau schließen zu können, wurde eine abiotische Kontrolle ohne Belebtschlamm durchgeführt. Weiter wurde der Abbau einer Referenzsubstanz mit bekannter Abbaubarkeit beobachtet, um die Funktionalität des eingesetzten Belebtschlammes zu überprüfen. Schlussendlich wurde noch eine Blindwertkontrolle durchgeführt. Abb. 9 zeigt den Verlauf des biologischen Sauerstoffbedarfs (BSB) über den Versuchszeitraum.



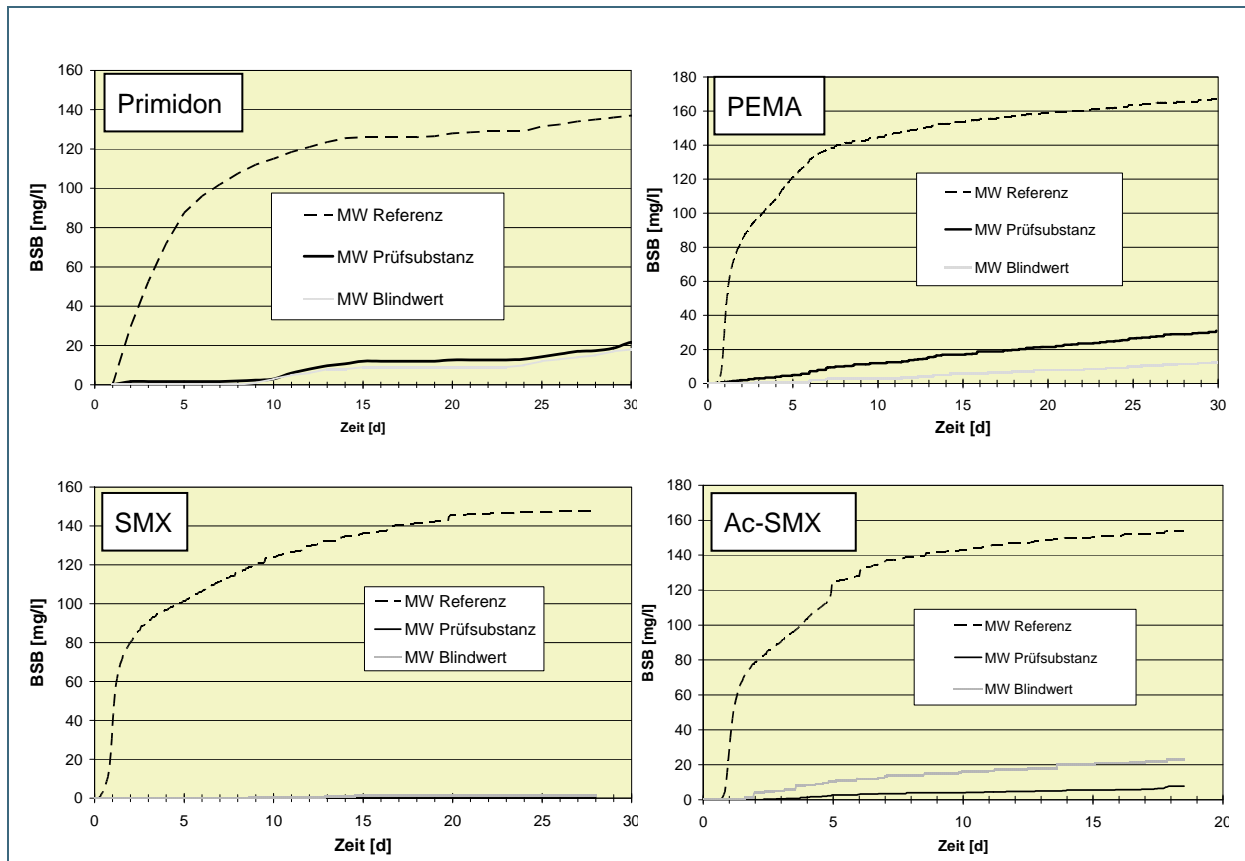


Abb. 9: Mittelwerte der BSB-Ganglinien im geschlossenen Respirometer (Prüfsubstanzen (je n=4): 50 mg/l Primidon (links oben), 50 mg/l PEMA (rechts oben); 100 mg/l SMX (links unten) und 50 mg/l Ac-SMX (rechts unten); Referenzen (n=2) jeweils 100 mg/l Natriumbenzoat; alle Ansätze: 0,03 g/l Belebtschlamm)

Die BSB-Verläufe in den Referenzansätzen, welche alle nach einer kurzen lag-Phase stark ansteigen und als Endwert auf den theoretischen Sauerstoffbedarf (167 mg/l) der Referenz zulaufen, beweisen die hohe Abbaueffizienz des eingesetzten Belebtschlammes. Alle Blindwerte steigen nur leicht, aber stetig an und liegen am Ende des Versuchs deutlich unter den maximal erlaubten 60 mg/l. In den abiotischen Kontrollen wurde keine Elimination nachgewiesen.

Der Sauerstoffverbrauch in den Prüfansätzen beträgt in keinem Fall 60 % des jeweiligen theoretischen Sauerstoffbedarfs; d.h. keine der untersuchten Substanzen kann als biologisch leicht abbaubar eingestuft werden. Bei Primidon, SMX und Ac-SMX übersteigt der mittlere BSB des Prüfansatzes den Blindwert nicht, woraus sich folgern lässt, dass kein biologischer Abbau stattgefunden hat. Bei PEMA beträgt der mittlere BSB des Prüfansatzes nach 28 Tagen 31 mg/l im Vergleich zu 12 mg/l beim Blindwert, was einer Mineralisierung von 20 % entspricht. Dies bedeutet, dass PEMA generell einem biologischen Abbau zugänglich ist, welcher jedoch nur langsam vonstatten geht.

Die potenzielle biologische Abbaubarkeit der Substanzen – wobei im Gegensatz zur leichten Abbaubarkeit höhere Belebtschlammkonzentrationen eingesetzt werden - wurde im Zahn-Wellenstest (DEV, 2000, L25) bestimmt. Auch hier kann sowohl der Primärabbau über spezifische Analytik als auch die Mineralisierung über die CSB- und DOC-Abnahme gemessen werden. In Abb. 10 sind die blindwert-korrigierten Ganglinien der DOC-Elimination von jeweils drei Parallelansätzen der Prüfsubstanzen (Primidon, PEMA, Ac-SMX, SMX, Oxipurinol) sowie der jeweiligen abiotischen Kontrollen und der Referenzsubstanz über die Testverläufe dargestellt.

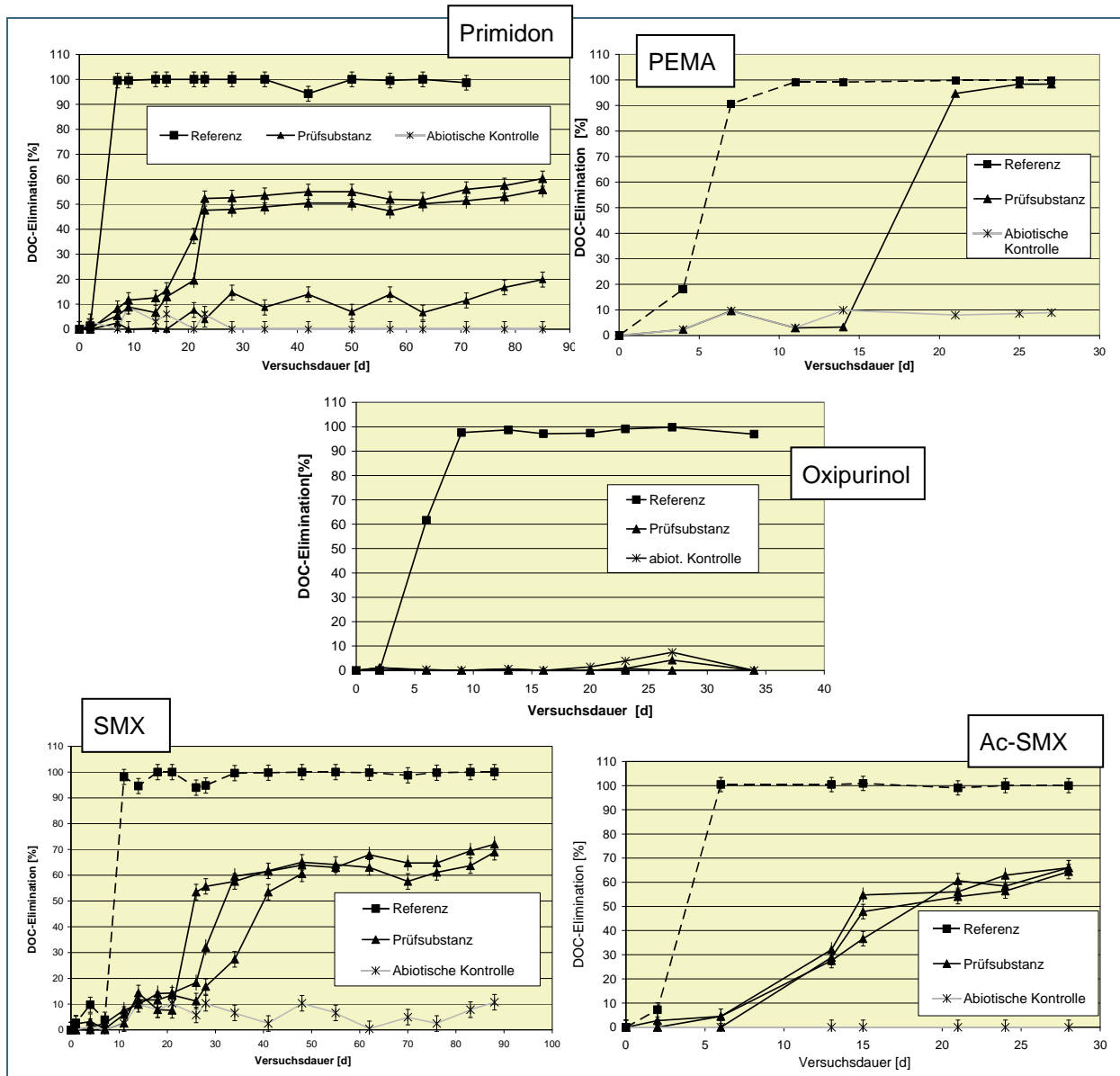


Abb. 10: Ganglinien der DOC-Elimination im Zahn-Wellenstest (Prüfsubstanz 100 mg/l Primidon (oben links) bzw. mg/l PEMA (oben rechts) bzw. 100 mg/l Oxipurinol (Mitte); 100 mg/l SMX (unten links), 50 mg/l Ac-SMX (unten rechts); Referenz jeweils 112 mg/l Diethylenglykol, jeweils 0,2 g/l Belebtschlamm, nur abiotische Kontrollen: Prüfansätze ohne Belebtschlamm)

Der schnelle, vollständige Abbau der Referenzsubstanz in allen Ansätzen kennzeichnet die hohe Aktivität des eingesetzten Belebtschlammes. Die abiotischen Kontrollen zeigen keine signifikanten Eliminationen durch Sorption oder nichtbiologische Abbauprozesse.

Bei der Primidon-Untersuchung steigt die DOC-Elimination der Prüfansätze in den ersten 15 Tagen nur leicht an. Danach findet bei zwei von drei Ansätzen eine verstärkte DOC-Elimination statt. Um den weiteren Verlauf aufzuklären, wurde der Versuch über die übliche Versuchsdauer von 28 Tagen hinaus verlängert. Es zeigt sich, dass die DOC-Elimination nicht vollständig war, sondern bei ca. 50–60 % ein Plateau erreicht. Der dritte Prüfansatz folgt diesem Trend nicht, sondern schwankt zwischen 10 und 20 %. Aus dem Versuch lässt sich folgern, dass Primidon unter diesen forcierten Bedingungen zwar grundsätzlich biologisch abbaubar ist, d.h. dass manchen Bakterien Enzyme zur Verfügung stehen, die Primidon verwerten können. Allerdings ist dieser Abbau zum einen nicht vollständig (maximale DOC-Elimination nur 60 %) und darüber hinaus nicht in allen Ansätzen erkennbar.

Ein ähnliches Bild ergibt sich aus der PEMA-Untersuchung. Hier hat in einem der drei Prüfansätze eine 100%ige Elimination stattgefunden, während in den beiden anderen Prüfansätzen PEMA nicht eliminiert wurde. In diesem Fall lässt sich die gesteigerte Elimination des einen Ansatzes auf ein konkretes Ereignis zurückführen: in diesem Ansatz war über Tage die Luftzufuhr ausgefallen. Es kann angenommen werden, dass hierdurch fakultative Anaerobier, die PEMA verwerten können, einen Standortvorteil hatten, hochgewachsen sind und auch unter erneuter Luftzufuhr aktiv waren. Durch Animpfen der anderen, konstant belüfteten Ansätze nach dem hier dargestellten 28tägigen Versuchsverlauf konnte auch eine Elimination erzielt werden.

Oxipurinol, der Metabolit des Gichtmittels Allopurinol, wurde im Zahn-Wellenstest im 28tägigen Versuchsverlauf nicht eliminiert.

Bei SMX steigt die DOC-Elimination der Prüfsubstanz in den ersten 20 Tagen nur leicht an. Danach findet – zeitlich leicht versetzt – bei allen drei Ansätzen eine verstärkte DOC-Elimination statt. In der Versuchsverlängerung über die üblichen 28 Tage hinaus zeigte sich, dass die DOC-Elimination nicht vollständig war, sondern bei ca. 60-70 % ein Plateau erreichte. Daraus lässt sich schließen, dass während des Abbaus von SMX ein stabiler Metabolit gebildet wurde, der selbst bis zu einer Versuchsdauer von 90 Tagen nicht weiter abgebaut wurde. Dies wurde auch durch die direkte Messung von SMX über HPLC/UV bestätigt, bei der am 90. Tag kein SMX mehr nachgewiesen wurde.

Die Abbaukurven der Prüfansätze von Ac-SMX verlaufen ähnlich wie die von SMX. Zwar ist die Adaptionzeit der Mikroorganismen mit ca. einer Woche deutlich kürzer, allerdings findet auch hier kein vollständiger Abbau statt, sondern die Mineralisierung endet bei ca. 60-70 %. Somit bleibt festzuhalten, dass SMX und Ac-SMX im Zahn-Wellenstest erst nach einer Adaptionphase biologisch abgebaut wurden, dieser Abbau jedoch nicht vollständig ist. Der oder die beim Abbau entstandene(n) Metabolit(en) sind als stabil einzustufen. Daraufhin wurde eine Identifizierung dieses/r Metaboliten mittels hochauflösender Massenspektroskopie durchgeführt. Dabei konnten die Ergebnisse des Zahn-Wellenstests für folgende Überlegung genutzt werden: SMX hat 10 Kohlenstoffatome, von denen beim Zahn-Wellenstest 60 % mineralisiert wurden. Geht man von der Annahme aus, dass nur ein Metabolit quantitativ entstanden ist, so müsste dieser folglich 4 Kohlenstoffatome aufweisen. Da Sulfamethoxazol aus einer p-Aminosulfonsäuregruppe mit 6 Kohlenstoffatomen und einem Isoxazolring mit 4 Kohlenstoffatomen besteht, wurde bei der Identifizierung des unbekanntes Metaboliten zuerst die Masse des Isoxazolrings ( $M = 98 \text{ g/mol}$ ) überprüft. Das erhaltene Massenspektrum ist in Abb. 11 dargestellt.

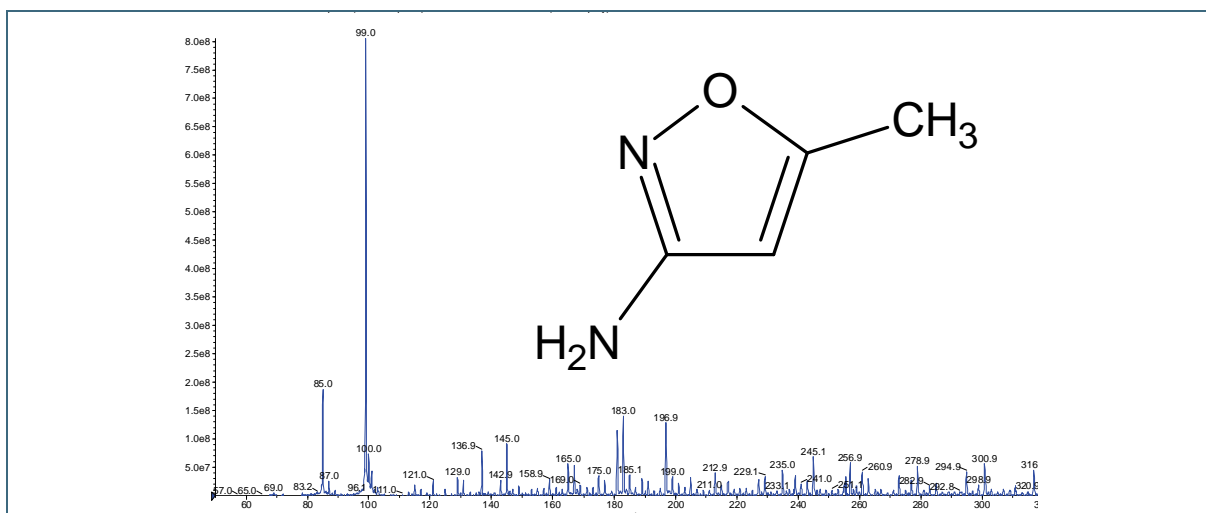


Abb. 11: Massenspektrum der Reaktionslösung von SMX im Zahn-Wellenstest, welche den zu identifizierenden Metaboliten enthält (positiver Messmodus)

In diesem Ansatz wurde die Substanz 3-Amino-5-methyl-isoxazol eindeutig identifiziert. Ein Nachweis in realen Proben (Abwasser, Oberflächenwasser) war jedoch nicht möglich, so dass diskutiert werden muss, ob dieser Metabolit in realen Wässern noch weiter abgebaut wird.

Der biologische Abbau von Primidon, PEMA, SMX, Ac-SMX, Glu-SMX, Oxipurinol und Ritalinsäure unter umweltrelevanten Bedingungen wurde in Laborkläranlagen (LfU, 2008) untersucht. Dazu wurde jeweils zwei bis vier Prüfanlagen nach einer Einlaufphase mehrere Wochen lang das Arzneimittel zudosiert, so dass die Zulaufkonzentration im umweltrelevanten Bereich bei 1 µg/l lag. Die Konzentrationen wurden einmal wöchentlich im Zulauf und zweimal pro Woche im Ablauf mittels LC/MS bestimmt. Der zeitliche Verlauf der über alle Prüfanlagen gemittelten Elimination (Abbau und Sorption) ist in Abb. 12 dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der einzelnen Messwerte wieder.

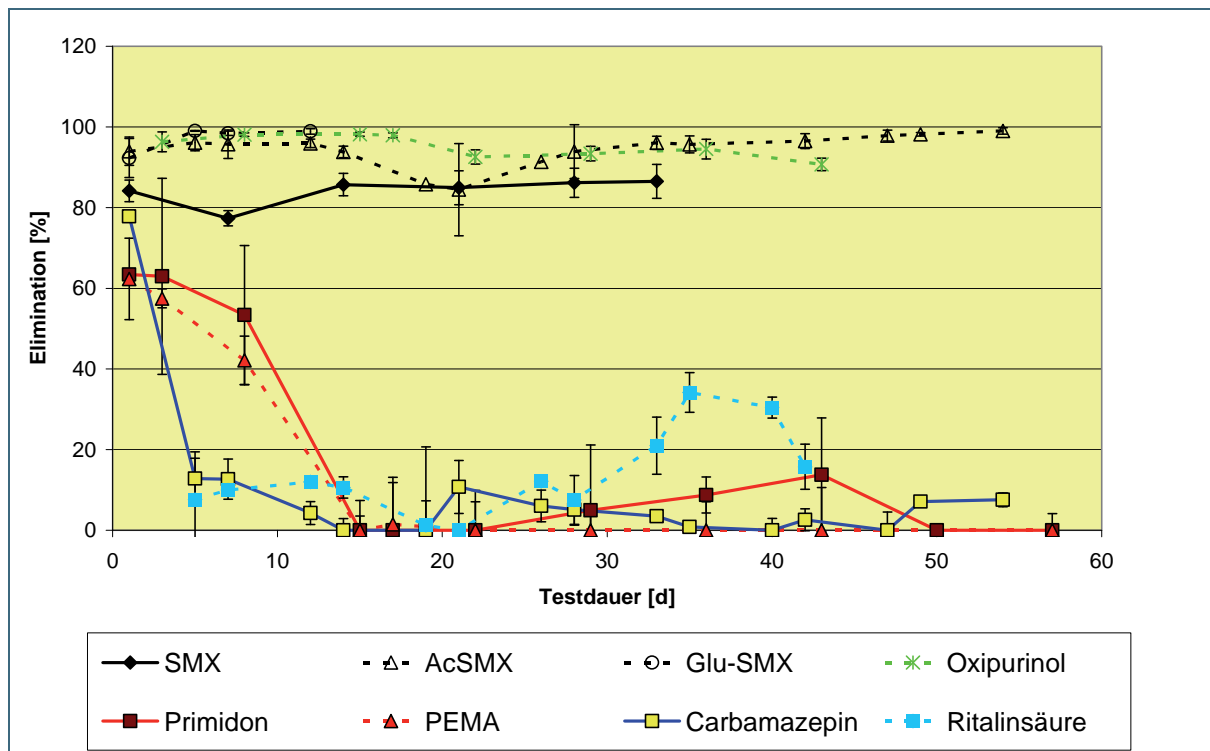


Abb. 12: Ganglinien der Elimination der Arzneimittel-/Metaboliten in Laborkläranlagen (Dosierung 1 µg/l; Mittelwert und einfache Standardabweichung von zwei bis vier Prüfanlagen)

SMX und seine beiden humanen Metaboliten wurden ohne Adaptionszeit direkt von den Mikroorganismen der Kläranlage gut abgebaut. Im Mittel betrug die Elimination von SMX  $84 \pm 3 \%$ , von Ac-SMX  $94 \pm 4 \%$  und von Glu-SMX  $97 \pm 3 \%$ . Die geringe Schwankungsbreite zwischen den vier Prüfanlagen belegt die konstant gute Elimination der Sulfonamide. Außerdem konnte beim Abbau von Ac-SMX und Glu-SMX im Ablauf der Kläranlagen SMX nachgewiesen werden. Damit wurde bewiesen, dass aus den Metaboliten im Verlauf des Klärprozesses die Muttersubstanz SMX zurückgebildet wurde. Dabei ist davon auszugehen, dass das nachgewiesene SMX nur einen Teil des insgesamt gebildeten SMX darstellt, da dieses in einer Folgereaktion schnell weiter abgebaut wird.

Bislang liegen keine Vergleichsstudien vor, die sich mit der Elimination von den humanen SMX-Metaboliten in Kläranlagen beschäftigen haben. Nur eine Studie hat bislang in einer realen Kläranlage die Elimination der Summe von SMX + Ac-SMX betrachtet, die im gesamten Klärprozesses 62 % betrug (Göbel et al., 2005). Diese Elimination ist etwas geringer als in den Laborkläranlagen, was im Wesentlichen auf zwei Effekte zurückgeführt werden kann:

1. In realen Kläranlagen liegt neben den gemessenen Substanzen SMX und Ac-SMX auch Glu-SMX vor, aus welchem im Klärprozess SMX gebildet wird. Der Einfluss von Glu-SMX wurde jedoch bei der Bilanzierung von Göbel et al. nicht berücksichtigt, wodurch eine scheinbar geringere SMX-Elimination bestimmt wurde.
2. Im Gegensatz zu realen Kläranlagen werden die Laborkläranlagen im Mittel bei höheren Temperaturen (konstant bei 20 °C) betrieben, wodurch die Geschwindigkeit des biologischen Abbaus steigt.

Primidon und PEMA zeigen zu Beginn des Versuchs eine ca. 60 %ige Elimination, die stetig abnimmt und nach ca. zwei Wochen bis auf Null gesunken ist. Diese Elimination ist wahrscheinlich nicht auf biologischen Abbau, sondern Sorption am Belebtschlamm zurückzuführen. Im Verlauf des Versuchs bleibt die Elimination gering, auch wenn die Messwerte – was anhand der teilweise hohen Fehlerbalken ersichtlich ist – partiell große Schwankungen aufweisen. Bei PEMA ergibt sich rechnerisch gegen Ende des Versuchs sogar eine negative Elimination, d.h. die Zulaufkonzentration ist geringer als die Ablaufkonzentration. Zeitgleich trat in den Laborkläranlagen ein verstärktes Wachstum des Fadenbakteriums *Thiothrix* sp. auf, wodurch sich Blähschlamm entwickelte. Die Änderung der Belebtschlamm-biozönose oder die daraufhin erfolgte Fällung des Blähschlammes mit Eisen(II)-salzen könnte zu einer verstärkten Ablösung von adsorbiertem PEMA vom Belebtschlamm führen, womit eine negative Elimination begründet werden könnte. Auf die Effizienz der Kläranlagen bezüglich des Kohlenstoffabbaus (98 %) bzw. Stickstoffabbaus (80 %) hatte der Blähschlamm jedoch keine negativen Auswirkungen, so dass die Abbaustudie trotz der Blähschlammproblematik in den letzten Wochen als repräsentativ anzusehen ist.

Die Literaturangaben zur Elimination von Primidon in Kläranlagen sind nicht eindeutig. Metzger et al. (2004) und Schneider (2004) errechneten an sechs Kläranlagen eine mittlere Elimination von 40 % mit einer Streuung von 0 bis 99 %. Eine solch hohe Streuung ist meist in einer nicht-korrespondierenden Probenahme begründet und somit sind die Werte für die Ermittlung der Elimination nur bedingt nutzbar. Nach Kahle et al. (2009) ist die Elimination von Primidon in Kläranlagen vernachlässigbar.

Mit Ausnahme der ersten Probe wurde Carbamazepin beim Durchlaufen der Kläranlagen nicht signifikant eliminiert. Die Elimination von Carbamazepin betrug im Mittel 5 % und ist – was durch die niedrigen Fehlerbalken erkennbar ist – in allen vier Anlagen vergleichbar. Der Verlauf der Eliminationskurve bleibt nach einer Eingewöhnungszeit von ca. einer Woche über die Dauer des Versuchs (acht Wochen) konstant. Eine Adaption der Biozönose an das Substrat findet daher auch nach längerer Zeit nicht statt.

Die biologische Abbaubarkeit von Carbamazepin in kommunalen Kläranlagen war schon häufiger Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Möhle und Koautoren (1999) stellten im Batchreaktor nur innerhalb der ersten 15 Minuten eine Konzentrationsabnahme fest, danach blieb die Konzentration konstant. Die anfängliche Elimination i. H. v. ca. 40 % wurde auf Sorptionseffekte zurückgeführt. Auch zeigen Messungen des Zu- und Ablaufs von kommunalen Kläranlagen, dass Carbamazepin nicht signifikant eliminiert wird (Ternes, 1998; Heberer, 2002a; Clara et al., 2004; Joss et al., 2005; Düring et al., 2006; Gómez et al., 2007). Im Rahmen einer Dissertation wurde von Clara (2003) der Abbau von Carbamazepin in Laborkläranlagen und realen Kläranlagen untersucht. Weder in den Laborkläranlagen (vier Ansätze mit einem Schlammalter von 1-26 d), noch in den vier betrachteten realen Kläranlagen wurde Carbamazepin eliminiert (Clara, 2003; Strenn et al., 2004). Die Literaturdaten und die Messdaten ergeben übereinstimmend, dass Carbamazepin in Kläranlagen nicht biologisch abgebaut wird.

Ritalinsäure, der Hauptmetabolit des ADHS-Mittels Ritalin, wird von Beginn an nur in geringem Umfang eliminiert. Nach 30 bis 40 Tagen steigt die Eliminationsrate leicht auf 15-40 % an. Dieses Verhalten kann auf zwei mögliche Ursachen zurückgeführt werden:

1. eine Adaption der Mikroorganismen an das Substrat Ritalinsäure
2. mit zunehmender Laufzeit der Laborkläranlagen führt die permanente mechanische Belastung des Belebtschlammes zu einer Erhöhung der Anzahl freischwimmender Bakterien, was durch mikroskopische Messungen bestätigt wurde. Da diese eine höhere Zugänglichkeit zum Substrat haben, kann dadurch der Abbau gesteigert werden.

Ein Vergleich mit Literaturdaten ist bei Ritalinsäure nicht möglich, da bislang keine Studien über das Verhalten bei der Abwasserreinigung vorliegen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Arzneimittel-/Metaboliten in Kläranlagen in unterschiedlichem Ausmaß eliminiert werden. Dabei scheint die Eliminationsrate der einzelnen Substanzen eher von den Stoffeigenschaften/Substanzklassen abzuhängen, was der Vergleich der gut abbaubaren Sulfonamide (SMX, Ac-SMX und Glu-SMX) bzw. der schlechten Elimination von Primidon/PEMA zeigt. Ebenfalls deutlich wurde, dass die Metaboliten hinsichtlich ihrer Abbaubarkeit keine deutliche Verbesserung im Vergleich zu den Muttersubstanzen zeigen, d.h. durch die Zunahme der Polarität wird keine signifikante Verbesserung der Abbaubarkeit induziert. Hinzu kommt, dass beim biologischen Abbau manche Metaboliten (Ac-SMX, Glu-SMX) wieder zur Muttersubstanz zurückgebildet werden.

Beim Vergleich der verschiedenen biologischen Abbautests fällt auf, dass SMX, seine Metaboliten sowie Oxipurinol in den Laborkläranlagen unter umweltrelevanten Bedingungen sehr gut biologisch abgebaut wurden, wogegen im Respirometer und im Zahn-Wellenstest kein oder ein unvollständiger Abbau (erst nach längerer Adaptionszeit) festgestellt wurde. Auch Primidon und sein Metabolit PEMA zeigen unterschiedliche Ergebnisse in den biologischen Abbautests. In Laborkläranlagen werden sie nicht signifikant eliminiert; aus den Zahn-Wellenstest ergeben sich jedoch Hinweise, dass beide Substanzen dem biologischen Abbau – zumindest unter forcierten Bedingungen – zugänglich sind.

Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Testverfahren sind nicht nur kinetischer, sondern auch mechanistischer Natur. So wurde der SMX-Metabolit 3-Amino-5-methyl-isoxazol im Zahn-Wellenstest gebildet und war dort über Wochen stabil, während in den Laborkläranlagen und in realen Gewässern kein Nachweis gelang.

Diese Diskrepanz ist wohl auf die - je nach eingesetztem Konzentrationsbereich und Co-Substrat - unterschiedlichen Metabolismen zurückzuführen. In den Standardtests auf leichte und potenzielle biologische Abbaubarkeit wird die Mineralisierung unter katabolischen Bedingungen untersucht (keine andere C-Quelle, hohe Konzentrationen), während in den Laborkläranlagen - wie auch in Realität – kometabolische Bedingungen vorherrschen.

Daraus wird deutlich, dass die Verwendung von standardisierten Testverfahren zur Einschätzung des Abbaus von Spurenstoffen in Kläranlagen eine große Fehlermöglichkeit birgt und die Ergebnisse im Einzelfall unter umweltrelevanten Bedingungen überprüft werden müssen. Deshalb wurde in diesem Projekt an einer Kläranlage eine Messkampagne durchgeführt, bei der die Elimination der Arzneimittelwirkstoffe/-Metaboliten im Verlauf der Kläranlage bestimmt wurde. Die 30.000 EW-Anlage besteht aus einer mechanischen Stufe (Rechen, Sandfang, Vorklärung) und einer biologischen Stufe mit vorgeschalteten Anaerobbecken (biologische Phosphatelimination) und intermittierender Belebung. Besonderes Augenmerk wurde bei der Probennahme darauf gelegt, im Verlauf der Kläranlage immer das gleiche Wasserpaket zu untersuchen, also eine korrespondierende Probennahme durchzuführen. Dazu wurden folgende Bedingungen eingehalten:

- Es wurden zeitlich versetzt durchflussproportionale 24h-Mischproben mit automatischen Probennehmern gezogen. Diese standen am Zulauf, am Ablauf Vorklärung, am Ablauf der Anaerobbecken und am Endablauf.
- Der zeitliche Versatz errechnete sich aus der Aufenthaltszeit des Abwassers bei Trockenwetter, die aus den Beckengrößen ermittelt wurde.

- Bei Regen, wenn die Abflüsse zunahmen, wurden die Probenahmen abgebrochen.

Die Mediane der gemessenen Konzentrationen aus fünf Serien sind in Abb. 13 dargestellt.

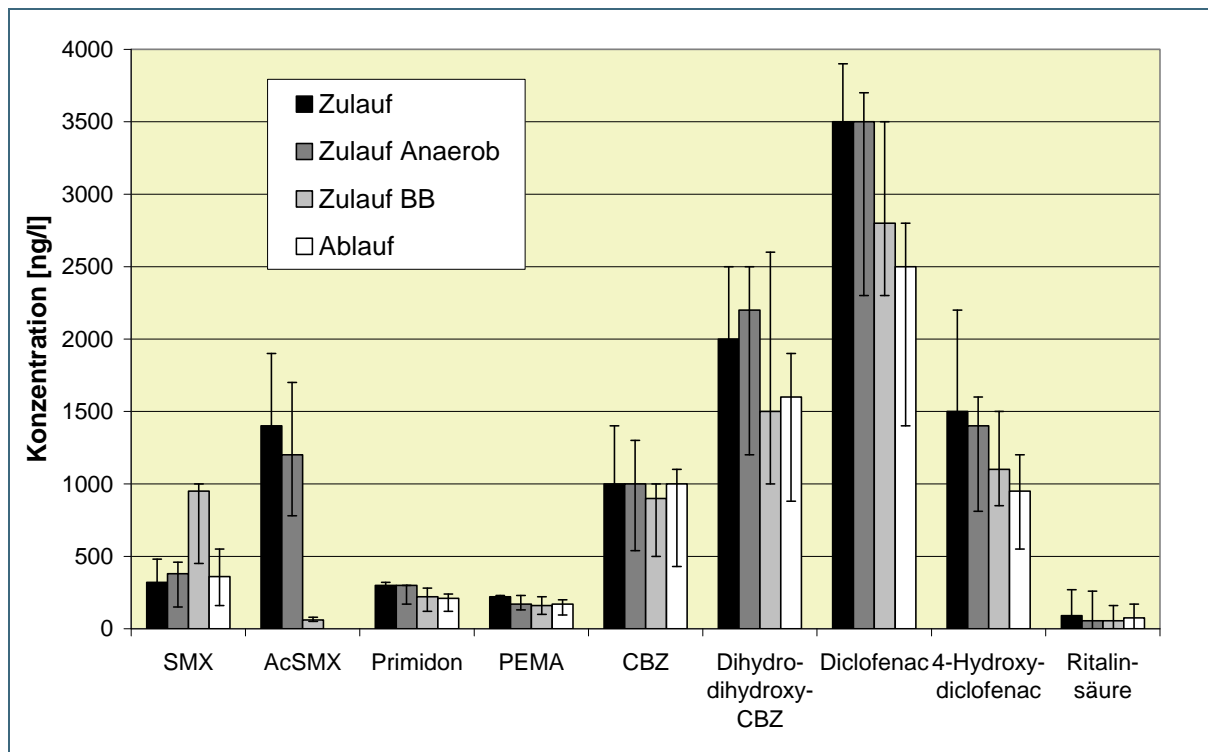


Abb. 13: Mediane (n=5) der Konzentrationen der Arzneimittel-/Metaboliten im Verlauf einer 30.000 EW-Kläranlage. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Messwerte wieder

Auf dem ersten Blick wird deutlich, dass die Konzentrationen der Wirkstoffe und der humanen Metabolite in der gleichen Größenordnung liegen. Die verkaufsstarken Arzneimittel wie Carbamazepin, Diclofenac und SMX sowie deren Metaboliten zeigen Konzentrationen im  $\mu\text{g/l}$ -Bereich. Primidon/PEMA und Ritalinsäure mit geringeren, einstelligen Jahrestonnagen finden sich im Konzentrationsbereich von 100-300 ng/l.

Das Abbauverhalten der Substanzen in der realen Kläranlage lässt sich anhand der in den Laborkläranlagen ermittelten Ergebnisse gut erklären. Ac-SMX wird gut und schnell abgebaut (mittlerer Abbau Laborkläranlage 94 %; mittlere Elimination Realkläranlage >95 %), so dass es im Ablauf der realen Anlage unter der Nachweisgrenze von 50 ng/l liegt. Bei diesem Abbau entsteht SMX, weshalb dieses im Verlauf der Kläranlage zunimmt, bevor es dann selbst weiter abgebaut wird (mittlerer Abbau Laborkläranlage 84 %). In der Realkläranlage ergibt sich rechnerisch für SMX eine negative Elimination (-37 %), die der SMX-Bildung im Klärverlauf Rechnung trägt.

Auch die ermittelten Konzentrationsverläufe von Primidon und PEMA sind in guter Übereinstimmung mit den Laborkläranlagen. Beide Untersuchungen deuten nicht auf einen Bioabbau der Substanzen hin. Die mittleren Eliminationen in der Realkläranlage liegen bei 31 % für Primidon und 21 % für PEMA.

Carbamazepin verhält sich in der realen Kläranlage (mittlere Elimination 10 %) wie vorher auch in den Laborkläranlagen inert. Die Konzentrationen des humanen Hauptmetaboliten CBZ-DiOH sind etwa doppelt so hoch. Auch wird dieser in geringem Umfang eliminiert; die mittlere Elimination beträgt 25 %.

Die höchsten Konzentrationen wurden für das Schmerzmittel Diclofenac gemessen. Dabei wird Diclofenac im Verlauf der Kläranlage im Mittel zu 32 % eliminiert; sein humaner Hauptmetabolit 4-Hydroxydiclofenac zu 40 %.

Erstmals gelang der Nachweis von Ritalinsäure in realen Kläranlagen. Die Konzentrationen liegen im Bereich von < 50 bis 270 ng/l. In guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Laborkläranlagen wird auch Ritalinsäure in der realen Kläranlage mit einer mittleren Elimination von 16 % kaum abgebaut.

### 3.2.2 Verbleib und Ökotoxizität in Oberflächengewässern

Auch im Oberflächengewässern werden SMX und seine humanen Metaboliten schnell biologisch abgebaut, wie die Eliminationskurven des Wasser-Sedimenttests für SMX, Ac-SMX und Glu-SMX belegen (Abb. 14).

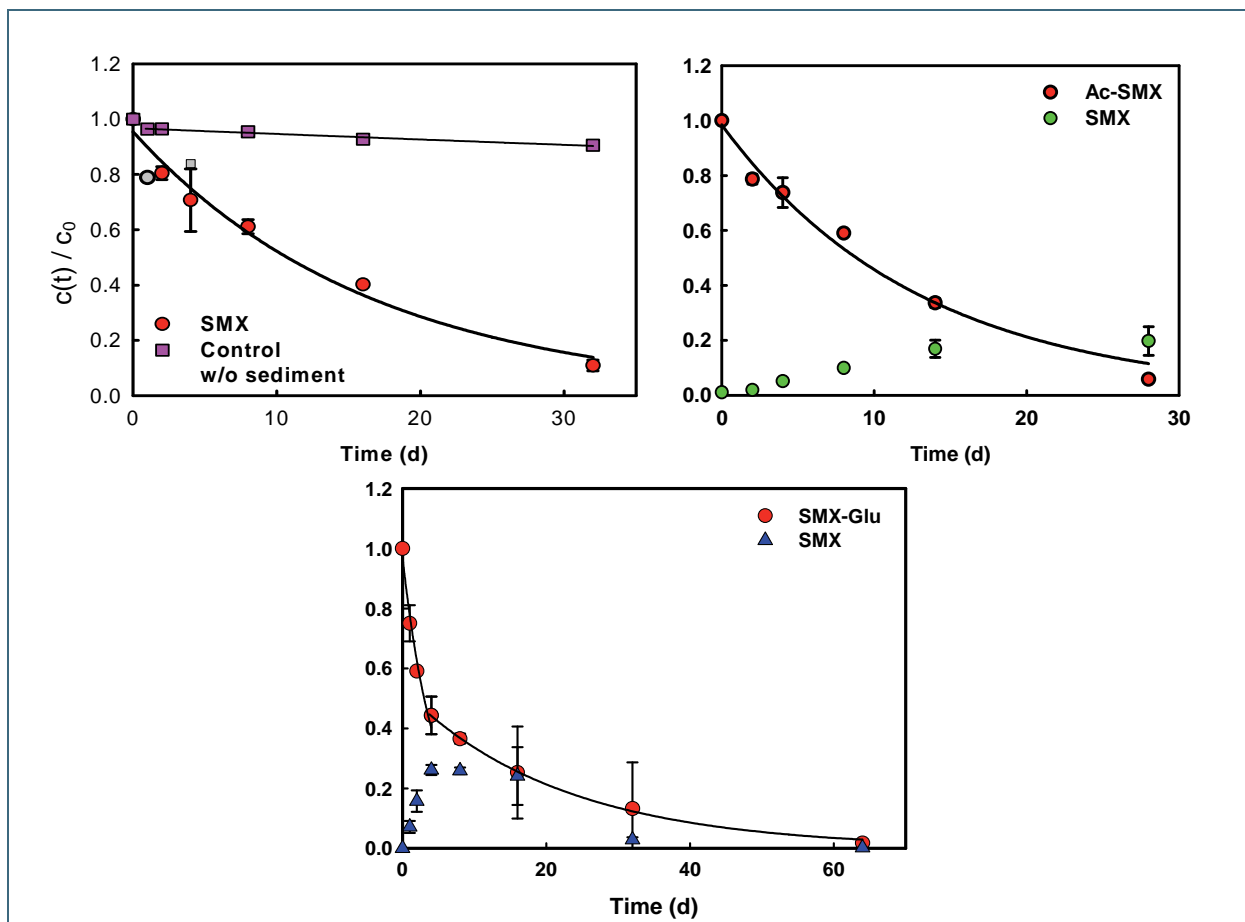


Abb. 14: Konzentrations-Zeit-Diagramm von SMX (oben links), Ac-SMX (oben rechts) und Glu-SMX (unten) im Wasser-Sedimenttest ( $c_0$  jeweils 40  $\mu\text{g/l}$ ; Sediment und Oberflächenwasser aus einem Altarm der Ammer bei Wielenbach)

SMX und Ac-SMX wurden mit Halbwertszeiten von 11,5 bzw. 9 Tagen in Anwesenheit von Sediment nach einer Kinetik erster Ordnung rasch abgebaut. Ohne Sediment fand der Abbau nur sehr langsam statt. In den (hier nicht gezeigten) Sterilkontrollen zeigte sich nach anfänglicher Sorption nur eine geringe Elimination, so dass der oben gezeigte Abbau eindeutig auf biologische Prozesse zurückgeführt werden kann. Beim Abbau des Glu-SMX lassen sich zwei Abbauphasen erkennen: Innerhalb der ers-



ten vier Tage fand mit einer Halbwertszeit von 3,1 Tagen ein sehr schneller Abbau statt, der sich danach verlangsamte ( $DT_{50}$ : 15,2 Tage). Diese Kinetik korreliert mit dem Sauerstoffgehalt im Sediment, welcher sich bis zum 4. Tag stark verminderte und dann auf niedrigem Niveau konstant blieb, so dass hier eine Verlangsamung des biologischen Abbaus unter Sauerstoffmangel vermutet wird.

Die in Oberflächengewässern nachgewiesenen Konzentrationen von SMX (höchster gemessener Wert in der Fränkischen Rezat: 190 ng/l) liegen deutlich unter der niedrigsten bekannten Effektkonzentration (LOEC) von 30 µg/l (siebentägiger Phototoxizitätstest an der Wasserlinse *L. gibba* (Brain et al., 2004, siehe Kapitel 3.1.2), so dass nicht von einer direkten Gefährdung der Wasserlebewesen durch SMX ausgegangen wird. Die für SMX abgeleitete PNEC (predicted no effect concentration) liegt mit einem Wert von 0,3 µg/l ebenfalls noch über der Gewässerkonzentration. Bezüglich der Ökotoxizität der humanen SMX-Metaboliten werden in der Literatur keine Daten angegeben.

Mit Primidon und PEMA wurde ebenfalls der Wasser-Sedimenttest durchgeführt. Dazu wurden 2,5 µg Primidon bzw. PEMA in 75 ml Oberflächenwasser gelöst und über die Versuchsdauer von 107 Tagen über ca. 10 g nativem Ammersediment langsam geschüttelt. Abb. 15 zeigt den Verlauf der absoluten Mengen in der Wasser- und Sedimentphase.

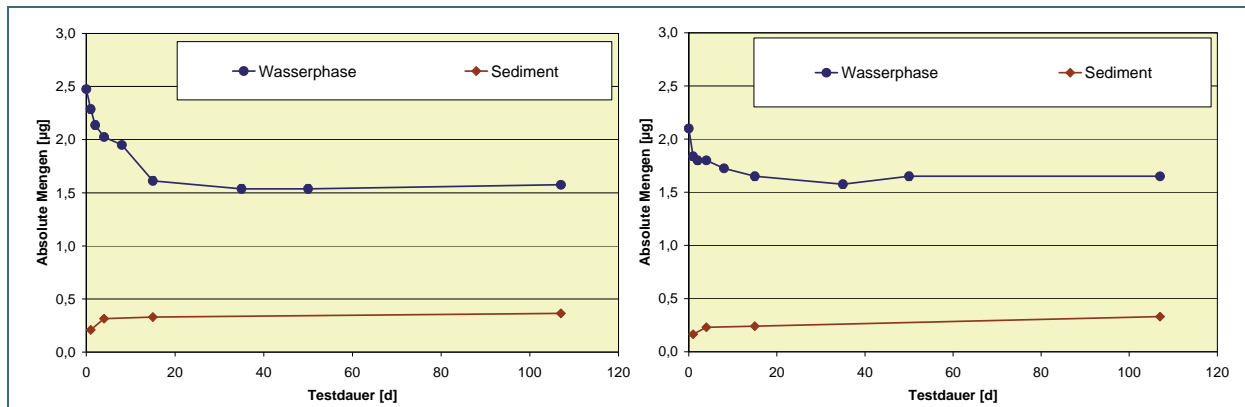


Abb. 15: Ganglinie von Primidon (links) und PEMA (rechts) in der Wasserphase und im Sediment über eine Testdauer von 107 Tagen ( $c_0 = 33 \mu\text{g/l}$ , Mittelwerte eines doppelten Ansatzes)

In den ersten zwei Versuchswochen nimmt Primidon in der Wasserphase um ca. 35 % ab; danach bleibt die Konzentration konstant. Ein Teil der Elimination ist mit einer Sorption am Sediment zu erklären; 15 % der eingesetzten Menge ist im Sediment nachzuweisen. Die restlichen 20 % sind entweder biologisch abgebaut oder als nicht-extrahierbare Rückstände am Sediment gebunden. Da die zusätzliche durchgeführte Sterilkontrolle leider trotz Autoklavieren nicht steril war, kann hierzwischen nicht unterschieden werden. Festzuhalten bleibt jedoch, dass Primidon selbst nach 100 Tagen nur zu 35 % aus Oberflächengewässern eliminiert wird und analog zum Annex XIII der REACH-Verordnung als „very persistent“ einzustufen wäre (Halbwertszeit im Wasser größer 60 Tage).

Der Wasser-Sedimenttest von PEMA ergibt ein ähnliches Bild. PEMA wird aus der Wasserphase im Mittel zu 21 % eliminiert, wovon sich ein Großteil (16 % der eingesetzten Menge) im Sediment wiederfindet. Ein signifikanter biologischer Abbau findet folglich nicht statt. Auch PEMA ist damit analog zum Annex XIII der REACH-Verordnung als „very persistent“ einzustufen.

In den untersuchten Oberflächengewässern wurde Primidon und sein Metabolit PEMA in Konzentrationen bis zu ca. 80 ng/l (Fränkische Rezat) gemessen. Eine PNEC-Kalkulation kann aufgrund fehlender Toxizitätsdaten nicht durchgeführt werden.

Da zu den Metaboliten PEMA bislang keine ökotoxikologischen Testergebnisse vorliegen, wurde als chronischer Wirktest exemplarisch ein 21d-Daphnienreproduktionstest von Referat 77/LfU durchgeführt. Dabei wurde Primidon und PEMA im Verhältnis 1:1 mit Konzentrationen von jeweils 2 µg/l bis 2 mg/l untersucht. Pro Konzentration wurden 10 Tiere eingesetzt und die Anzahl der Nachkommen innerhalb von 21 Tagen gezählt. Die mittleren Reproduktionsraten sind in Abb. 16 der Reproduktionsrate in der Kontrollansätzen gegenübergestellt.

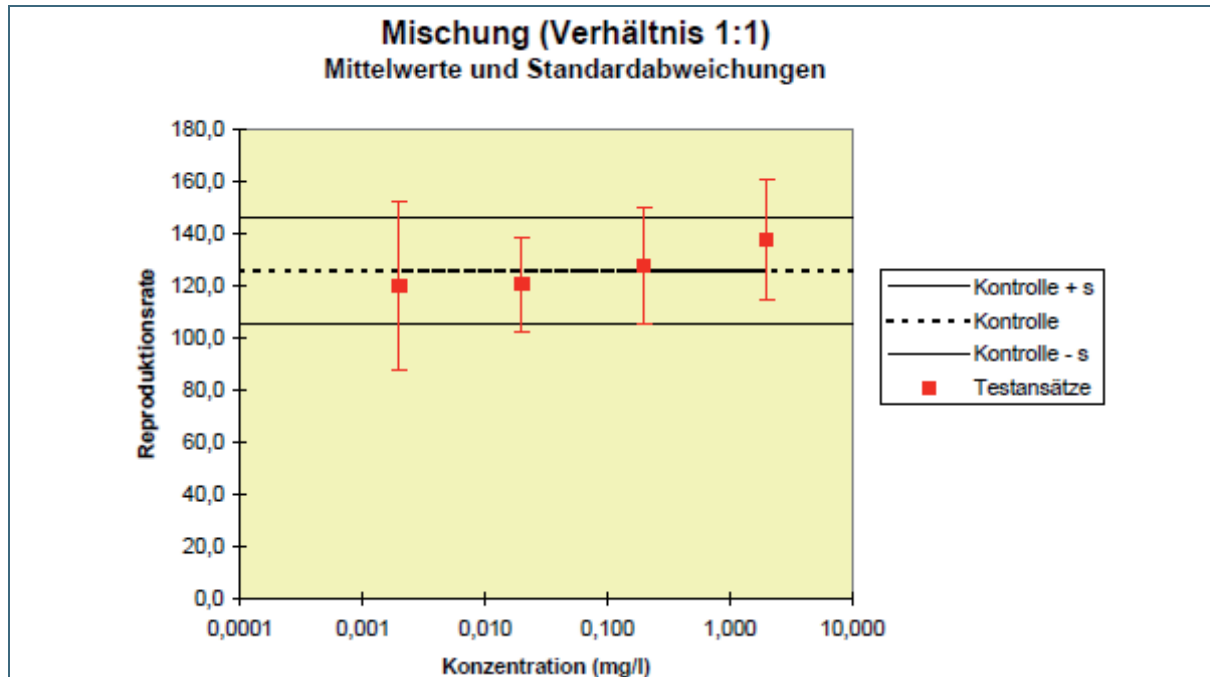


Abb. 16: Reproduktionsraten (Mittelwert und Standardabweichung) im 21d-Daphnientest bei Inkubation einer Mischung (1:1) von Primidon und PEMA im Vergleich zum Kontrollansatz. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf Messwerte, deren Stabilität im Versuchsverlauf überprüft wurde

In den Kontrollen wurden durchschnittlich  $126 \pm 20$  lebende Nachkommen pro Daphnie gezählt, womit das Validitätskriterium von mindestens 60 lebenden Nachkommen pro Daphnie erfüllt wurde. Eine Mortalität der Elterntiere wurde nicht beobachtet. Die mittleren Reproduktionsraten der Testansätze weichen nicht signifikant ( $p=0,05$ ; zweiseitig) von den Kontrollen ab. Damit wurde in der höchsten Konzentration von 2 mg/l kein Effekt festgestellt. Als NOEC (no observed effect concentration) kann deshalb ein Wert von  $> 2$  mg/l für eine 1:1-Mischung von Primidon und PEMA angenommen werden.

Die Ergebnisse belegen eine niedrige Toxizität von Primidon und PEMA gegenüber der Reproduktion von Daphnien im Zeitraum von 21 Tagen. Die Ökotoxizität von Primidon und PEMA lässt sich mit diesem Ergebnis nicht vollständig bewerten, da als Folge der organismischen Variabilität eine realistische Abschätzung der Ökotoxizität anhand eines Singlespezietests nicht möglich ist. Hierzu wären weitere, systematische Untersuchungen mit Organismen verschiedener trophischer Ebenen eines Ökosystems nötig.

### 3.2.3 Stofftransport in Uferfiltrat und Grundwasser

Arzneimittelrückstände werden in Spurenkonzentrationen in zahlreichen oberirdischen Gewässern und Grundwässern nachgewiesen und können bei Verwendung dieser Gewässer über die Trinkwasserversorgung bis ins Trinkwasser gelangen. In Bayern betrug 2004 der Anteil an Uferfiltrat und angereichertem Grundwasser an der Trinkwassergewinnung ca. 5 % (zum Vergleich: Nordrhein-Westfalen

40 %) (Schulte-Oehlmann et. al., 2007). Im Trinkwasser sind Arzneimittelwirkstoffe als anthropogene Spurenverunreinigungen aus Abwässern im Sinne des Vorsorgeprinzips und der Hygiene unerwünscht. Im Allgemeinen werden in Gewässern vor allem solche Arzneimittel gefunden, die eine hohe Persistenz und eine gute Wasserlöslichkeit besitzen und gleichzeitig in hohen Mengen angewendet werden. Es ist zu erwarten, dass diese Substanzen auch wenig Elimination während der Uferfiltration und der Untergrundpassage erfahren.

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wird u.a. anhand von Säulen-, Lysimeter- und Feldstudien das Verhalten von Humanarzneimitteln während der Bodenpassage untersucht. Bei der Auswahl der Arzneimittelwirkstoffe wurden hohe Verbrauchsmengen in Deutschland (10-150 t/a), hohe Konzentrationen in Kläranlagenabläufen (bis in den µg/l-Bereich) sowie regelmäßige Funde in Fließgewässern zu Grunde gelegt. Zusätzlich zu den Wirkstoffen wurden deren wichtigste Metaboliten in die Untersuchungen einbezogen.

### 3.2.3.1 Säulenversuche

#### Ungesättigte Bodensäulen

Drei ungestörte Bodensäulen wurden aus dem alluvialen Auenboden in Wielenbach entnommen. Hierzu wurden Edelstahlrohre mit einer Länge von 60 cm und einem Durchmesser von 20 cm unmittelbar nebeneinander mit einem Bagger nach Entfernen des Oberbodens (Tiefe 20 cm) in den Boden gedrückt und anschließend ausgegraben. Der TOC-Gehalt des Bodens liegt bei 1,6-2,5 % und der Feinkornanteil (Ton- und Schlufffraktion) zwischen 80 % und 95 %. Der Boden ist mit einem pH-Wert von 7,4-7,8 leicht basisch. Die Bodensäulen wurden in einem Kühlraum bei 10°C aufgestellt und einmalig mit unterschiedlichen Arzneimittelwirkstoff-/ Metaboliten-Mischungen beaufschlagt. Stoffe und verabreichte Mengen sind Abb. 17 bis Abb. 19 zu entnehmen. In wöchentlichen Abständen wurden die Säulen mit jeweils einem Liter Leitungswasser bewässert (entspricht 33 mm Niederschlag) und das austretende Sickerwasser aufgefangen. Zur Markierung der Sickerwasserfront wurde fünf Tage vor den Medikamentengaben ein konservativer Tracer (je 150 ml KBr-Lösung mit LF 30.000 µS/cm) auf den Säulen ausgebracht und bewässert. Im austretenden Sickerwasser wurden elektrische Leitfähigkeit, pH-Wert und Sauerstoffgehalt gemessen sowie aus einer wöchentlichen Mischprobe die Arzneimittelkonzentrationen mittels LC-MS/MS direkt bestimmt. Unter Einbeziehung der Sickerwassermengen wurden die Frachten und Wiederfindungsraten der einzelnen Wirkstoffe und Metaboliten ermittelt.

Das Sickerwasser der Säulen 1 bis 3 war mit einem pH-Wert von 7,6-7,9 schwach alkalisch, der Sauerstoffgehalt lag mit 8,5-9,5 mg/l nahe der Sauerstoffsättigung.

In der Bodensäule 1 (Abb. 17) brach der konservative KBr-Tracer mit dem austretenden Sickerwasser bereits nach einer Woche bzw. 33 mm Niederschlag durch. In den ersten drei Wochen des Säulenversuchs stieg die elektrische Leitfähigkeit von 430 µS/cm auf 1180 µS/cm an; in weiteren 2,5 Monaten ging sie nahezu kontinuierlich auf den Ausgangswert zurück. Im Falle von SMX, Primidon und PEMA trat der Durchbruch im Vergleich zum KBr-Tracer um zwei Wochen verzögert auf, CBZ-Epoxid wurde zwei Monate und CBZ erst vier Monate nach Tracerdurchbruch im Sickerwasser gemessen. Während der Durchbruch von SMX und PEMA zum größten Teil in den ersten Versuchswochen erfolgte, lagen die Konzentrationen von Primidon im Sickerwasser über einem Zeitraum von vier Monaten auf hohem Niveau. Nach zehn Monaten Versuchsdauer wurden 90 % der ausgebrachten Menge an Primidon im Sickerwasser gefunden, gefolgt von seinem Metaboliten PEMA mit 37 % und CBZ-Epoxid mit 27 %. Bei SMX wurde eine Wiederfindungsrate von 21 % und bei CBZ von lediglich 4 % ermittelt. Ac-SMX wurde zu keinem Zeitpunkt im Sickerwasser gefunden.

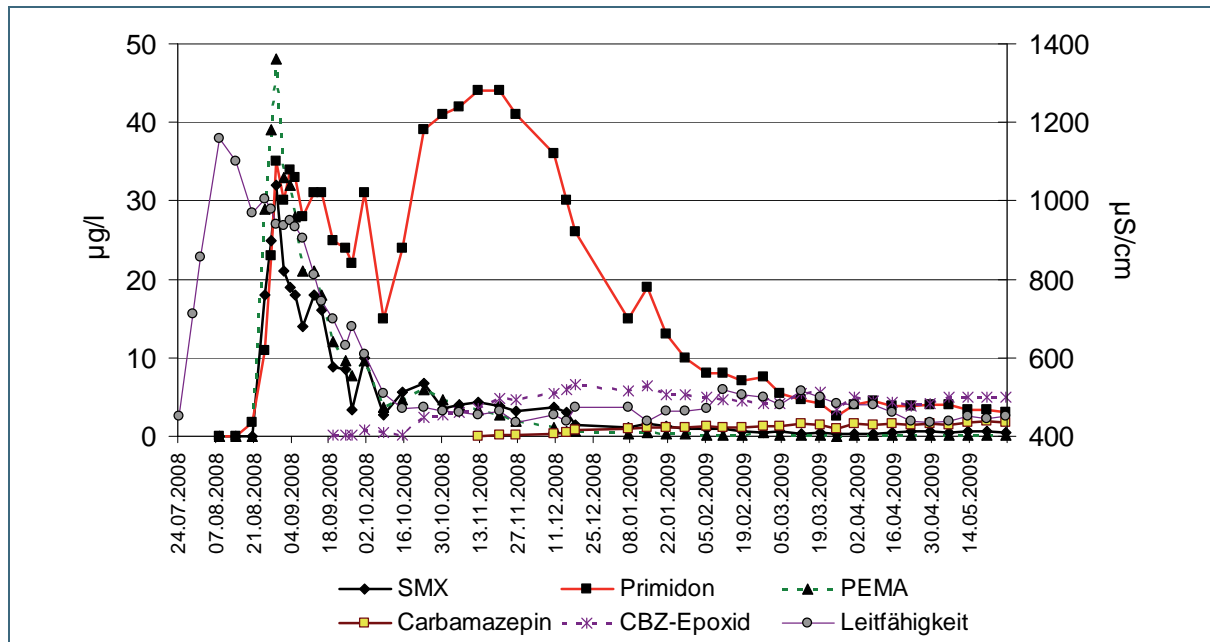


Abb. 17: Arzneimittelkonzentrationen im Sickerwasser (SW) der Säule 1  
 Aufgebrachte Stoffmengen [µg]: SMX 760; Primidon 740; CBZ 830;  
 Ac-SMX 480; PEMA 980; CBZ-Epoxid 990

Im Gegensatz zur Bodensäule 1 stieg die elektrische Leitfähigkeit des Sickerwassers in Säule 2 erst nach 3 Wochen deutlich an (Abb. 18), was auf eine geringere Durchlässigkeit des Bodens schließen lässt. Der Arzneimitteldurchbruch erfolgte 3-4 Wochen nach Ausbringung. Dies bedeutet, dass das Rückhaltevermögen des Bodens gegenüber den Arzneimittelwirkstoffen ähnlich ausgeprägt ist wie gegenüber dem konservativen KBr-Tracer. Von den drei ausgebrachten Arzneimittelwirkstoffen wurden SMX, Primidon und CBZ im austretenden Sickerwasser detektiert, letzterer jedoch nur in einem niedrigen Konzentrationsbereich (max. 2,4 µg/l). Während einer Versuchsdauer von zehn Monaten und 1500 mm Niederschlag wurden 81 % des ausgebrachten Primidons, 12 % SMX und lediglich 5 % CBZ mit dem Sickerwasser ausgewaschen.

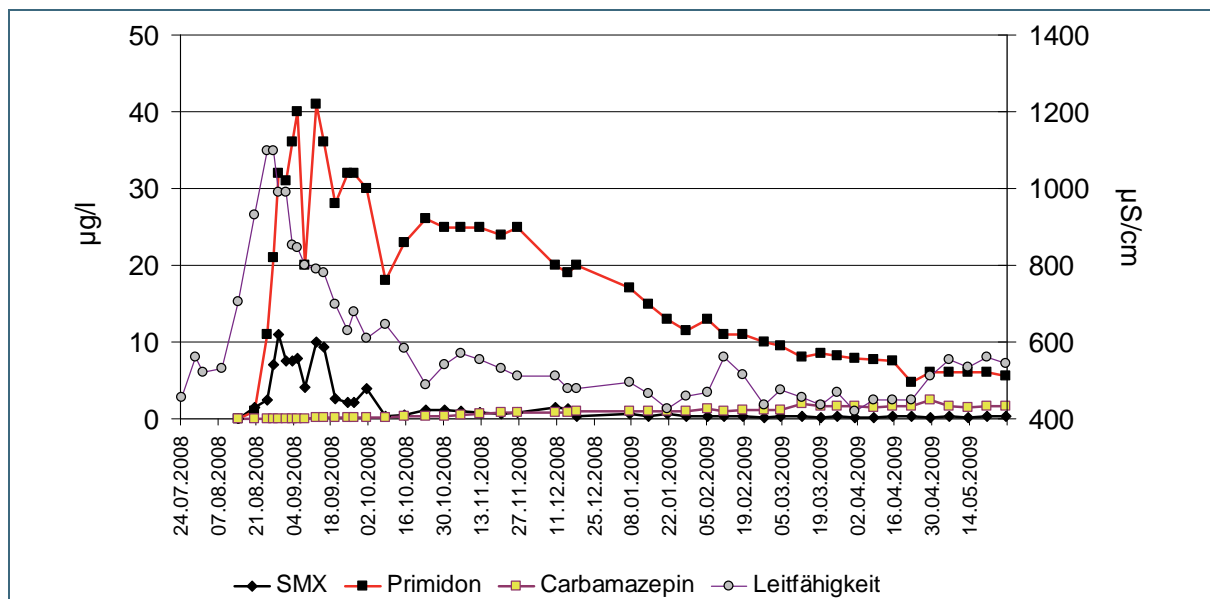


Abb. 18: Arzneimittelkonzentrationen im Sickerwasser (SW) der Säule 2  
 Aufgebrachte Stoffmengen [µg]: SMX 760; Primidon 740; CBZ 830

In Säule 3 war ein Durchbruch des Tracers mit dem Sickerwasser erst nach 4-5 Wochen bzw. 165 mm Beregnung zu messen (Abb. 19). Nach der gleichen Zeitspanne trat im Sickerwasser als einziger der drei ausgebrachten Wirkstoffmetaboliten PEMA auf. Insgesamt wurden von diesem Stoff 20 % der verabreichten Menge mit dem Sickerwasser verfrachtet.

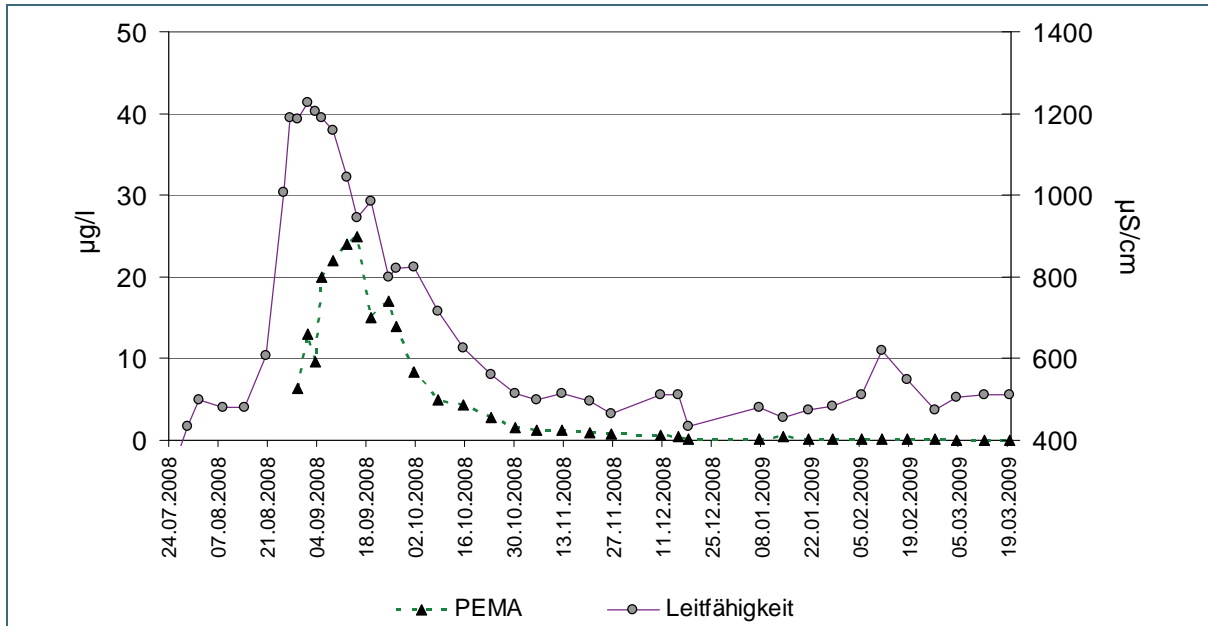


Abb. 19: Arzneimittelkonzentrationen im Sickerwasser (SW) der Säule 3  
 Aufgebrachte Stoffmengen [µg]: Ac-SMX 480; PEMA 980; CBZ-Epoxid 990

In Tab. 4 sind die Wiederfindungsraten von Arzneimittelwirkstoffen/Metaboliten im Sickerwasser der Bodensäulen zusammengefasst. Hier zeigt sich, dass die Stoffe in den einzelnen Säulen in z.T. sehr unterschiedlichem Maße verfrachtet werden. Die Tatsache, dass die Säulen unmittelbar nebeneinander gestochen wurden, macht die starke Inhomogenität des Bodens selbst auf einer kleinen Fläche deutlich.

Tab. 4: Wiederfindungsraten von Arzneimittelwirkstoffen/Metaboliten im Sickerwasserabfluss der Bodensäulen

	SMX	Ac-SMX	Primidon	PEMA	CBZ	CBZ-Epoxid
Säule 1	21 %	0 %	90 %	36 %	4 %	27 %
Säule 2	12 %	----	81 %	----	5 %	----
Säule 3	----	0 %	----	20 %	----	0 %

### Gesättigte Aquifersäulen

Mit Hilfe eines Säulenfräsgerätes wurden drei ungestörte Aquifersäulen (AS) nebeneinander aus dem alluvialen Auenboden in Wielenbach entnommen (Abb. 20). Hierzu wurden die oberen Bodenschichten auf einer Fläche von 10x6 m bis zu einer Tiefe von 1,3 m abgetragen und anschließend die Edelstahlrohre mit einer Länge von 60 cm und einem Innendurchmesser von 30 cm bis auf den Grundwasserspiegel gefräst und ausgegraben. Am Tag der Entnahme (17.03.09) lag der Grundwasserspiegel sehr niedrig, d.h. zu Zeiten höherer Niederschläge befindet sich die beprobte Bodenschicht im Grundwasseranstaubereich.



Abb. 20: Säulenfräsgerät

In Tab. 5 sind die pH-Werte, TOC-Gehalte sowie Korngrößenverteilungen der Aquifersäulen aufgelistet. Demnach ist das Aquifermaterial leicht basisch, es weist nur einen geringen organischen Anteil auf und ist gemäß der Korngrößenverteilung als Sand mit geringem Schluffanteil zu charakterisieren.

Tab. 5: Korngrößenverteilungen, pH-Werte und TOC-Gehalte der Aquifersäulen

Säule	Horizont [cm]		pH	TOC [g/kg TS]	Korngröße
<b>AS1</b>	0-30	feinsandiger Schluff	7,6	3,5	Sand: 75 % Schluff: 21 % Ton: 4 %
	30-60	Sand mit schluffreichen Einlagerungen	7,4	1,5	Sand: 99,3 % Schluff: 0,2 % Ton: 0,1 %
<b>AS2</b>	0-30	feinsandiger Schluff	8,0	1,8	Sand: 95 % Schluff: 4 % Ton: 1 %
	30-60	Sand mit schluffreichen Einlagerungen	7,6	1,9	Sand: 99,7 % Schluff: 0,2 % Ton: 0,1 %
<b>AS3</b>	0-20	feinsandiger Schluff	7,7	2,9	Sand: 86 % Schluff: 12 % Ton: 2 %
	20-60	Sand mit schluffreichen Einlagerungen	8,0	1,8	Sand: 96,2 % Schluff: 3,3 % Ton: 0,5 %

Die Aquifersäulen wurden in einem Kühlraum bei 10°C aufgestellt und kontinuierlich mit einer Arzneimittelwirkstoff-/ Metaboliten-Mischung beaufschlagt (SMX, Primidon, PEMA, Carbamazepin, CBZ-Epoxid, CBZ-DiOH). Die Konzentrationen der Spurenstoffe lagen im Zulauf i.d.R. zwischen 0,8 und 1 µg/l. Lediglich in der zweiten Versuchshälfte wurden die Zulaufkonzentrationen für die Dauer von drei Wochen auf 0,4-0,6 µg/l eingestellt. Säule AS2 wurde mit Hilfe einer Schlauchpumpe von unten nach oben durchströmt, bei den Säule AS1 und AS3 verlief der Sickerwasserfluss dagegen frei von oben nach unten. Die Bodenkörper waren während der gesamten fünfmonatigen Versuchsdauer mit Wasser überstaut, d.h. sie befanden sich in einem wassergesättigten Zustand. Das Porenvolumen betrug mit 13 Litern 35 % des Säulenvolumens. Die Säulen AS1-AS3 wurden mit insgesamt 150 l / 130 l / 90 l Sickerwasser durchströmt, was rechnerisch einem 12- / 10- / 7-fachen Austausch des Porenwassers entspricht. Im austretenden Sickerwasser wurden pH-Wert und elektrische Leitfähigkeit gemessen sowie aus wöchentlichen Mischproben die Arzneimittelkonzentrationen mittels LC-MS/MS direkt bestimmt. Unter Einbeziehung der Sickerwassermengen wurden die Frachten und Wiederfindungsraten der einzelnen Wirkstoffe und Metaboliten ermittelt.

Die Säulen AS1 und AS2 zeigten im Auswaschungsverhalten der Spurenstoffe sehr ähnliche Verläufe. Nach dem Austausch eines Porenvolumens (entspricht ca. 3 Wochen Versuchsdauer) wurden bereits Primidon, PEMA und SMX im austretenden Sickerwasser nachgewiesen (Abb. 21). Weitere drei Wochen später erreichten die Konzentrationen von Primidon und PEMA im Sickerwasser die Zulaufwerte, d.h. das Rückhaltevermögen des Bodens gegenüber diesen Stoffen war erschöpft. Nach Halbierung der Zulaufkonzentrationen ging die Belastung des Sickerwassers mit Primidon / PEMA nach Austausch eines Porenvolumens ebenfalls auf den halben Wert zurück. SMX wurde lediglich während der ersten Versuchshälfte im Sickerwasser nachgewiesen. Nach dieser Adaptionsphase konnte sich wahrscheinlich eine Bakterienbiozönose entwickeln, die imstande war, SMX abzubauen. Carbamazepin brach mit dem Sickerwasser erst nach dem Austausch von sieben Porenvolumen durch und erreichte zum Versuchsende 20 % der Zulaufkonzentration. Ein ähnlicher Wert wurde auch für CBZ-Epoxid gemessen. Für den polareren Metaboliten CBZ-DiOH war das Rückhaltevermögen des Bodens deutlich geringer ausgeprägt.

Im Vergleich zu AS1 und AS2 brachen die aufgebrauchten Substanzen in Aquifersäule AS3 etwas verzögert und in geringerer Konzentration durch (Abb. 22). CBZ wurde zu keinem Zeitpunkt im Sickerwasser gefunden. Insgesamt spiegelte sich jedoch das oben beschriebene Sickerverhalten der Spurenstoffe wider.

Insgesamt wurde nach fünfmonatiger Versuchsdauer bzw. sieben- bis zwölflichem Austausch des Porenwassers ein Großteil der aufgebrauchten Menge an Primidon und PEMA mit dem Sickerwasser ausgewaschen (Abb. 23). Ein begrenzter Rückhalt des Bodens ist auch im Falle des Carbamazepin-Metaboliten CBZ-DiOH zu erkennen. Dagegen wurden SMX, CBZ und CBZ-Epoxid in der Aquifersäule zu über 80 % zurückgehalten.

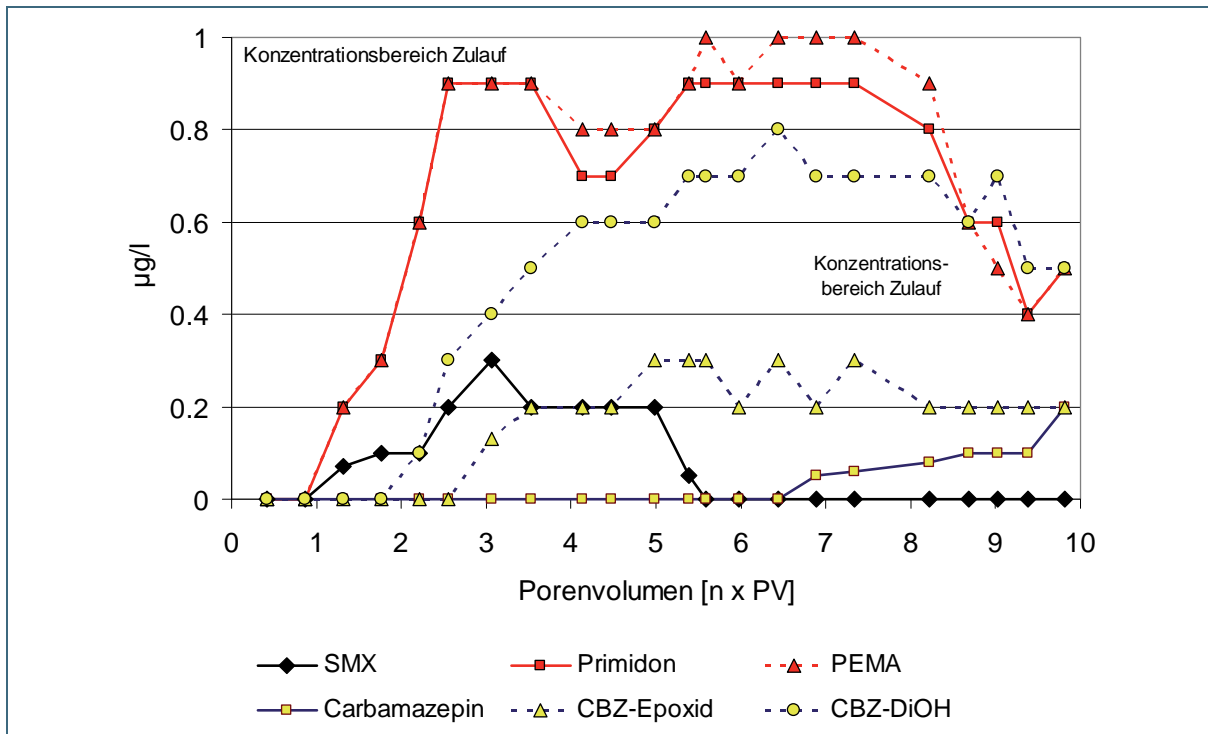


Abb. 21: Arzneimittelkonzentrationen im Sickerwasser (SW) der Aquifersäule 2

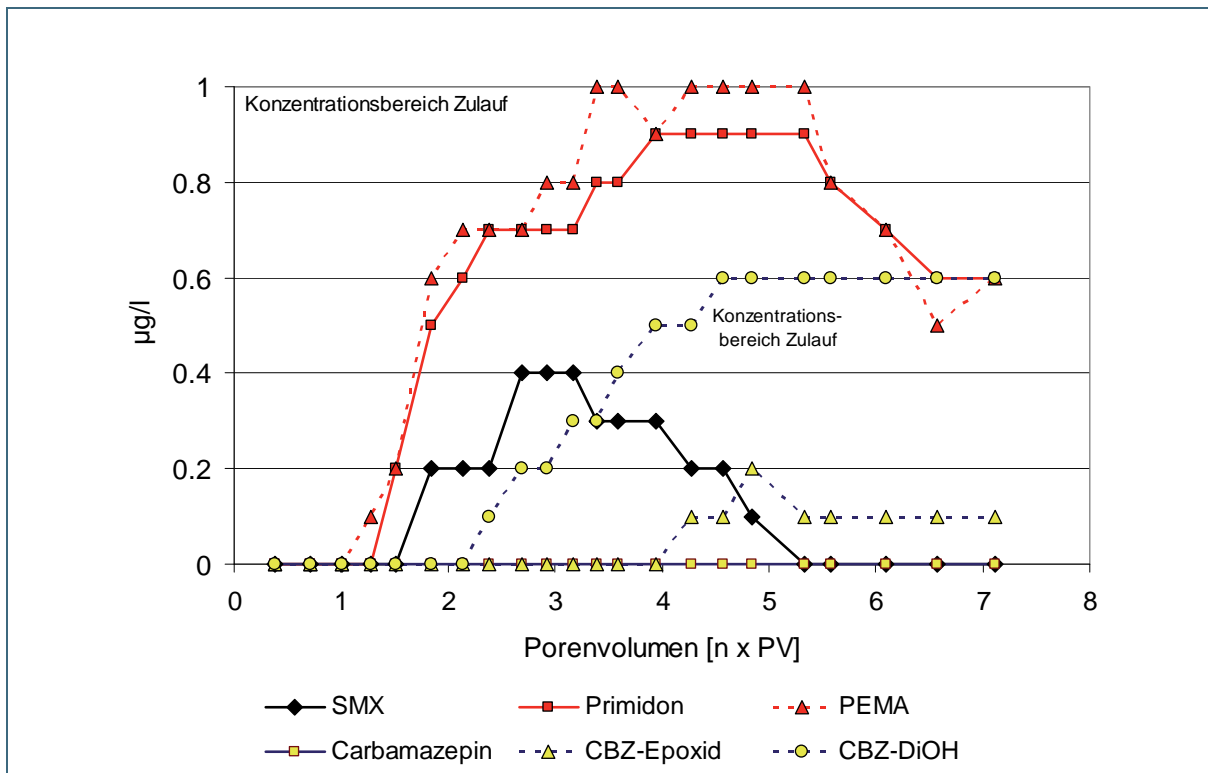


Abb. 22: Arzneimittelkonzentrationen im Sickerwasser der Aquifersäule 3



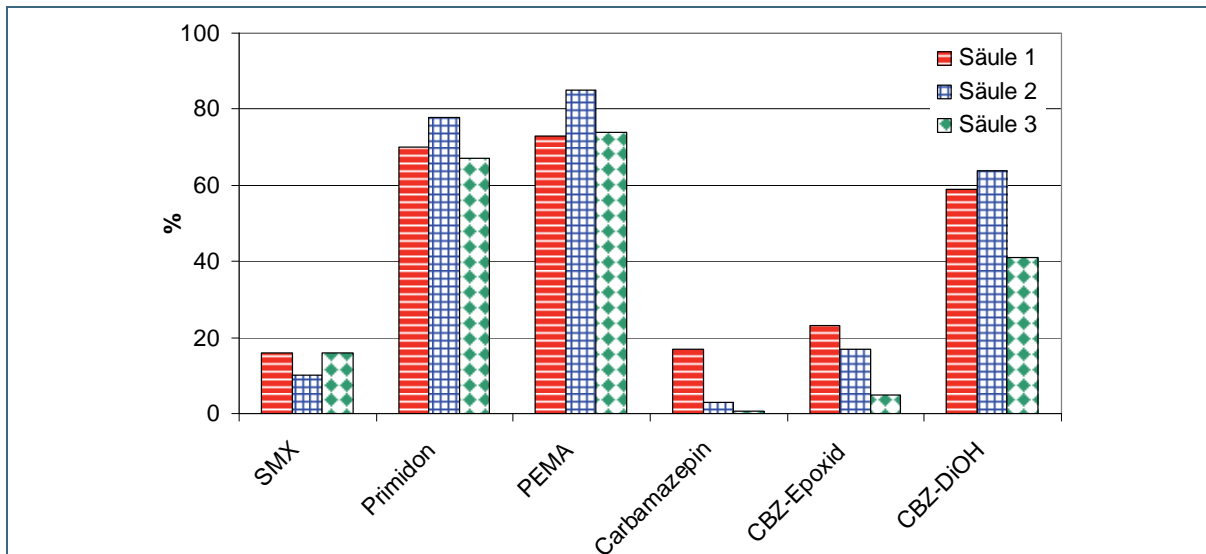


Abb. 23: Wiederfindungsraten der Arzneimittelwirkstoffe im Sickerwasser

### Lysimeterversuche

Die Halbschalenlysimeter befinden sich zum einen im ungestörten alluvialen Auenboden (mittlerer Feinkornanteil 67 %, TOC 1,9 %, pH 7,6), zum anderen im künstlich geschütteten Kiesboden. Ausgehend von einem Schacht wurden in 90 cm und 150 cm Tiefe jeweils drei PVC-Halbschalen mit einer Länge von 5 m (Auffangfläche 0,6 m<sup>2</sup>) leicht ansteigend in den Boden getrieben. Die Schalen verlaufen im Winkel von 60° strahlenförmig auseinander, wobei beide Ebenen um 30° zueinander versetzt liegen. Die Arzneimittelwirkstoff-/Metaboliten-Mischungen wurden in 500 l Wasser gelöst und flächenhaft auf den Lysimetern ausgebracht. Stoffe und verabreichte Mengen sind Abb. 24 und Abb. 25 zu entnehmen. Mit Hilfe einer Beregnungsanlage wurde unmittelbar nach der Applikation ein Niederschlag von 10 mm simuliert, um Wirkstoffe und Metaboliten in den Boden einzuwaschen. Nach fünf Tagen wurde auf den Lysimetern (Fläche 10 m x 10 m) ein Starkregen von 75 mm in 3 Stunden simuliert. Der Sickerwasserfluss setzte in den Halbschalen 30 Minuten bis 4 Stunden nach Beregnungsbeginn ein. Das über die Halbschalen austretende Sickerwasser wurde als stündliche Mischprobe aufgefangen und die Abflussmengen über Kippzähler bestimmt. Die Stoffkonzentrationen wurden direkt mittels LC-MS/MS ermittelt.

Im ungestörten Auenboden flossen insgesamt 4,5 % der Beregnungsmenge über die Halbschalen ab. Das unterschiedliche Abflussverhalten der einzelnen Halbschalen ist auf die verschieden stark ausgeprägte Anbindung an das Makroporensystem unter der Versuchsfläche zurückzuführen. Vergleichbar mit den Säulenversuchen wurden von den sechs ausgebrachten Arzneimittelwirkstoffen/Metaboliten SMX, Primidon, PEMA und CBZ im Sickerwasser gefunden (Abb. 24). Die Stoffe Ac-SMX und CBZ-Epoxid wurden im Boden vollständig zurückgehalten. Das Antiepileptikum Primidon erreichte im Sickerwasser wiederum die höchsten Konzentrationen. Von den ausgebrachten Mengen wurden insgesamt 0,43 % Primidon, 0,34 % PEMA und SMX sowie 0,15 % CBZ im Sickerwasserabfluss (Summe aller Halbschalen) wiedergefunden. Diese Werte liegen mehr als Faktor 10 unter der Auffangrate des Beregnungswassers, was auf eine gewisse Rückhaltefunktion des Bodens gegenüber diesen Substanzen schließen lässt.

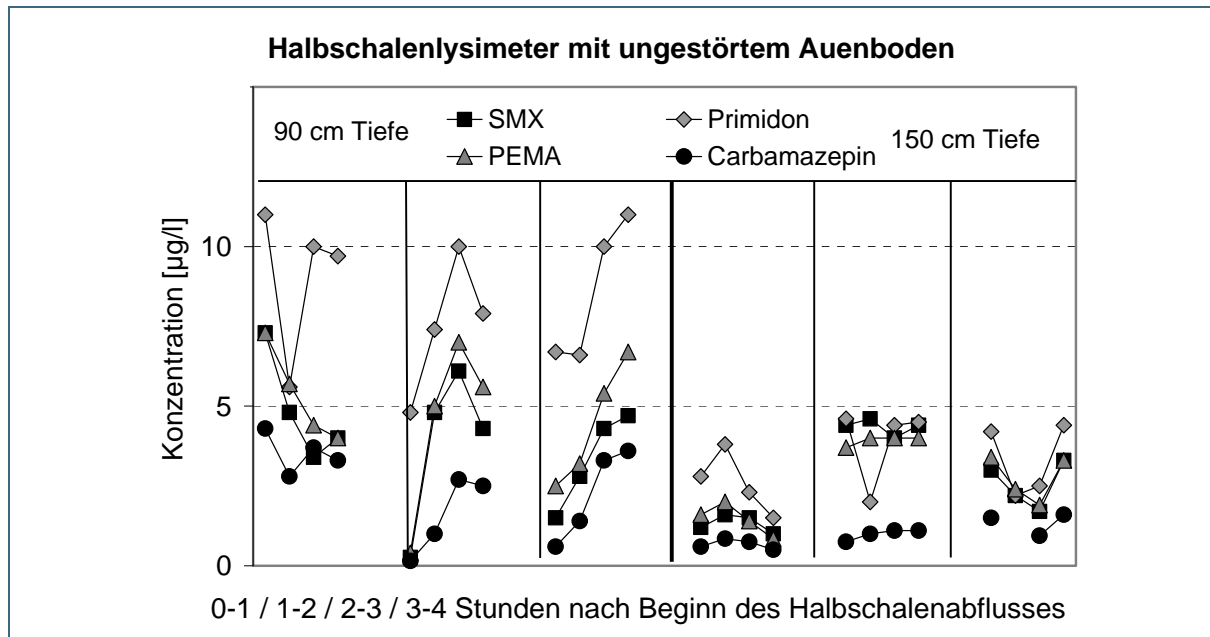


Abb. 24: Arzneimittelkonzentrationen in den stündlichen Mischproben der Halbschalenabflüsse im ungestörten Auenboden (links Halbschalen in 90 cm Tiefe; rechts Halbschalen in 150 cm Tiefe)  
 Aufgebrachte Stoffkonzentrationen [µg/l]: SMX 680; Primidon 700; CBZ 640;  
 Ac-SMX 610; PEMA 710; CBZ-Epoxid 670

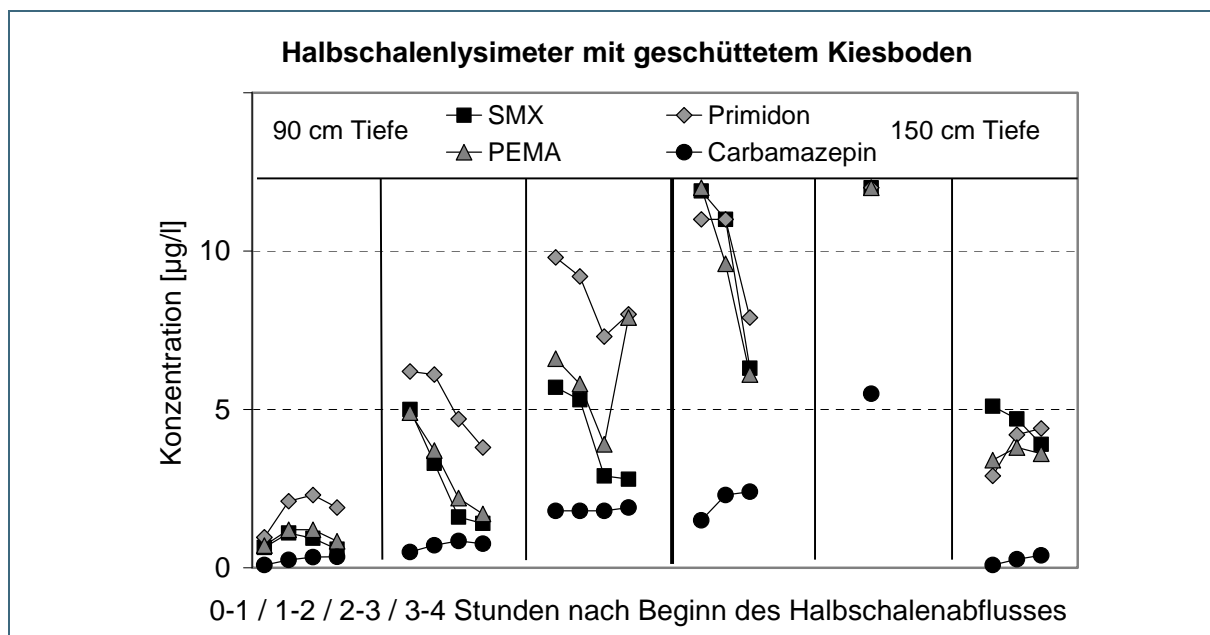


Abb. 25: Arzneimittelkonzentrationen in den stündlichen Mischproben der Halbschalenabflüsse im geschütteten Kiesboden (links Halbschalen in 90 cm Tiefe; rechts Halbschalen in 150 cm Tiefe)  
 Aufgebrachte Stoffkonzentrationen [µg/l]: SMX 970; Primidon 1050; CBZ 900;  
 Ac-SMX 900; PEMA 920; CBZ-Epoxid 810

Im geschütteten Kiesboden wurde lediglich 1 % des aufgetragenen Beregnungswassers mit den Halbschalen lateral abgeleitet. Diese im Vergleich zum ungestörten Auenboden deutlich niedrigere Aufnahmerate ist wahrscheinlich auf ein fehlendes intaktes Makroporensystem zurückzuführen. Die Arzneimittelkonzentrationen im Sickerwasser des Kiesbodens (Abb. 25) zeigen insgesamt betrachtet eine wesentlich höhere Streubreite als die Werte im Auenboden. Von den sechs ausgebrachten Wirkstoffen / Metaboliten wurde Primidon im Kiesboden am stärksten verfrachtet. Insgesamt wurden 0,09 %

Primidon, 0,08 % PEMA, 0,07 % SMX und 0,02 % CBZ mit dem Sickerwasser ausgewaschen. Die Metaboliten Ac-SMX und CBZ-Epoxid wurden wiederum nicht im Sickerwasser nachgewiesen.

### Zusammenfassung der Säulen- und Lysimeterversuche

Die Untersuchungen mit den ungesättigten Bodensäulen und den wassergesättigten Aquifersäulen führten hinsichtlich des Rückhaltevermögens des Bodens gegenüber den untersuchten Arzneimittelwirkstoffen/Metaboliten zu weitestgehend vergleichbaren Ergebnissen.

- Das Antibiotikum SMX wird im Boden nach einer mehrwöchigen Adaptionsphase wahrscheinlich mikrobiell vollständig abgebaut. Ac-SMX wird vollständig zurückgehalten oder abgebaut.
- Das Rückhaltevermögen des Bodens gegenüber dem Antiepileptikum Primidon und seinem Metaboliten PEMA ist nach wenigen Monaten erschöpft.
- Das Antiepileptikum Carbamazepin und sein Metabolit CBZ-Epoxid wurden in den ungestörten Boden-/Aquifersäulen sowie in den Lysimetern zum größten Teil zurückgehalten. Das Porenvolumen der Säulen musste 2- bis 7-mal ausgetauscht werden, bis CBZ im Sickerwasser nachgewiesen werden konnte. Dies entspricht einer Versuchsdauer von 1-4 Monaten. In einem Säulenversuch wurde CBZ sogar vollständig zurückgehalten. Der Metabolit CBZ-DiOH war dagegen in den Böden sehr mobil.

#### 3.2.3.2 Uferfiltrat / Grundwasser

Die Übertragbarkeit der im kleinräumigen Maßstab unter Einsatz von Säulen- und Lysimeterversuchen gewonnenen Ergebnisse auf Einzugsgebietsebene wird unter Berücksichtigung standortspezifischer Eigenschaften an Brunnen mit relevantem Uferfiltratanteil überprüft. Hierzu wurden Brunnen von Wasserversorgern ausgewählt (Tab. 6), deren Reinwasser im Sommer 2007 vergleichsweise hohe Carbamazepin-Konzentrationen aufwies (30-100 ng/l; die Daten entstammen dem LGL-Sonderuntersuchungsprogramm „Arzneimittelwirkstoffrückstände im Trinkwasser“). Die erste Beprobung der Brunnen und angrenzenden Oberflächengewässer erfolgte vom 22.-24.04.09, eine Wiederholungsbeprobung wurde vom 15.09.-17.09.09 durchgeführt. Zusätzlich zu den in den Säulen- und Lysimeterversuchen eingesetzten Arzneimittelwirkstoffen/Metaboliten wurde das Röntgenkontrastmittel Amido-trizoensäure sowie Ritalinsäure ins Messprogramm aufgenommen. Weiter wurden mengenmäßig wichtige Vertreter aus der Stoffgruppe der Korrosionsinhibitoren, der Flammschutzmittel, der Herbizide (Rübenspritzmittel) und der künstlichen Süßstoffe in die Messungen einbezogen. Die Messergebnisse zu den arzneimittelfremden Stoffen sind lediglich tabellarisch in Anhang 1 und Anhang 2 aufgeführt. Alle Stoffe mit Ausnahme der Flammschutzmittel (Analyse mit GC-MS nach flüssig-flüssig-Extraktion) wurden an einem LC-MS/MS-System (Sciex 4000 Q-Trap der Fa. Applied Biosystems) quantitativ bestimmt.

Tab. 6: Liste der in die Untersuchungen einbezogenen Wasserversorgungsunternehmen

<b>Wasserversorger</b>	<b>Wassergewinnungsgebiet</b>	<b>angrenzendes Gewässer</b>
anonymisiert	anonymisiert	Main
anonymisiert	anonymisiert	Main
anonymisiert	anonymisiert	Main
anonymisiert	anonymisiert	Main
anonymisiert	anonymisiert	Regnitz
anonymisiert	anonymisiert	Fränkische Rezat

In Tab. 7 sind die beprobten Brunnen mit ihren baulichen, geologischen und hydrologischen Charakteristika aufgelistet. Alle Brunnen befinden sich im sandigen bis kiesigen Untergrund. Die Entfernungen der Brunnen zum infiltrierenden Fließgewässer liegen im Bereich von 100 m bis 850 m. Die Fließdauer des Uferfiltrats variiert von ca. 30 Tagen bis zu ca. 600 Tagen. Während die beiden untersuchten tieferen Brunnen keinen Uferfiltratanteil aufweisen, liegt der Uferfiltratanteil mehrerer Brunnen bei nahezu 100 %. Die Abflusswerte des Mains lagen bei der Probennahme im April zu ca. 50 % und im September zu 20 % über dem jährlichen Mittel. Die Abflusssituationen an Regnitz und Fränkischer Rezat entsprachen zu beiden Terminen bzw. im April dem jährlichen Mittel, im September wies die Fränkische Rezat eine geringe Wasserführung auf.

Tab. 7: Beprobte Brunnen (anonymisiert)

	Geologie	Tiefe	Baujahr	Fördermenge	Entfernung Main	$k_f$ -Wert m/s	Fließdauer	Uferfiltratanteil	Main
A	quartäre Flusstüftung aus Sanden und Kiesen	13 m	2007	11 l/s	200 m	$1 \cdot 10^{-3}$	mind. 50 d	ca. 97 %	SW Neuer Hafen: 22.4.: 158 m <sup>3</sup> /s 16.9.: 125 m <sup>3</sup> /s MQ: 105 m <sup>3</sup> /s
B		12 m	1974	12 l/s	160 m	$1 \cdot 10^{-3}$	mind. 50 d	ca. 97 %	
C		12 m	2003	6 l/s	275 m	$1 \cdot 10^{-3}$	mind. 50 d	ca. 97 %	
D		10 m	1964	25 l/s	106 m	$1,7 \cdot 10^{-3}$	ca. 70 d	ca. 90 %	
E Horizontalbrunnen		10 m	1963	30 l/s	150 m	$1,7 \cdot 10^{-3}$	ca. 30 d	ca. 98 %	
F		10 m	2006	6 l/s	225 m	$1 \cdot 10^{-3}$	ca. 100 d	ca. 60 % starker landseitiger Einfluss v.a. im Winter	
	Geologie	Tiefe	Baujahr	Fördermenge	Entfernung Main	$k_f$ -Wert m/s		Sickerwasseranteil vom Main	Main SW
G	GW-Bereich: Mittelsand bis Grobkies oberer Bereich: Fein- Mittelsand mit Ton und Schluffeinlagerungen	10 m	ca. 1988	9-11 l/s	65 m	$4 \cdot 10^{-4}$		ca. 85 %	SW Neuer Hafen: 22.4.: 158 m <sup>3</sup> /s 16.9.: 125 m <sup>3</sup> /s MQ: 105 m <sup>3</sup> /s
H		7 m	ca. 1988	9-11 l/s	220 m	$4 \cdot 10^{-4}$		ca. 85 %	
I		7 m	ca. 1988	9-11 l/s	220 m	$4 \cdot 10^{-4}$		ca. 85 %	
	Geologie	Tiefe	Baujahr	Fördermenge	Entfernung zum Main	$k_f$ -Wert m/s	Fließdauer	Uferfiltratanteil	Main SW
J	Grobsand bis Mittelkies	10 m	1963	1,5 l/s	520 m	$3 \cdot 10^{-3}$	ca. 200 d zum Main min. 50 d zu Bächen	85%	SW Neuer Hafen: 22.4.: 158 m <sup>3</sup> /s 16.9.: 125 m <sup>3</sup> /s MQ: 105 m <sup>3</sup> /s
K	Feinsand bis Mittel- und Grobkies	8 m	1976	5 l/s	610 m	$3 \cdot 10^{-3}$	ca. 200 d zum Main min. 50 d zu Bächen	30%	
L	Sand-Kies Kalkstein Tonstein Sandstein <b>Tiefenbrunnen</b>	33 m	1995	7,5 l/s	730 m			kein	
M	Mittelsand schwach kiesig	11 m	1977	5 l/s	140 m	$5 \cdot 10^{-3}$	min. 50 d	ca. 97%	
N	Mittel- Grobsand, mittelkiesig	10 m	1995	5 l/s oder mehr	160 m	$5 \cdot 10^{-3}$	min. 50 d	100%	

	Geologie	Tiefe	Baujahr	Fördermenge	Entfernung Regnitz	$k_f$ -Wert	Fließdauer	Uferfiltratanteil	Regnitz
O	quartäre Lockergesteinsablagerungen, fein- bis mittelkörnige Sande mit Kiesschotter	17 m	1989	5-10 l/s	625 m	$4,7 \cdot 10^{-4}$	100-200 d	44 (35) %	Hüttendorf: 23.4.: 33 m³/s = MQ 15.9.: 32 m³/s
P		18 m	1989	5-10 l/s	625 m	$4,9 \cdot 10^{-4}$	200-300 d	57 (15) %	
Q		22 m	1989	5-10 l/s	670 m	$9,5 \cdot 10^{-4}$	100-200 d	75 (66) %	
R				5-10 l/s	850 m	$9,9 \cdot 10^{-4}$	200 -300	10%	
S		20 m		5-10 l/s	560 m	$6,6 \cdot 10^{-4}$	500-600 d	13 (50) %	
T		18 m	1998	5-10 l/s	420 m	$4,8 \cdot 10^{-4}$	100-200 d	79 (91) %	
U				5-10 l/s	450 m	$3,3 \cdot 10^{-4}$	100-200 d	64 (86) %	
V		18 m	2003	5-10 l/s	625 m	$3,3 \cdot 10^{-4}$	200-400 d	22 (38) %	

	Geologie	Tiefe	Baujahr	Fördermenge	Entfernung Rezat	$k_f$ -Wert	Fließdauer	Uferfiltratanteil	fränk. Rezat
W	Quartäre Niederterrassensande und Kiese		1967		140 m	$3,9 \cdot 10^{-4}$		bis 70%	Ansbach: 24.4.: 0,73 m³/s = MQ 17.9.: 0,45 m³/s
X			1967		200 m	$3,3 \cdot 10^{-4}$	200-240 d (Eosin)		
Y			2008		250 m	$3,9 \cdot 10^{-4}$	180 d (Rhodamin)		
Z		20 m	1967	ca. 15 l/s	150 m	$2,3 \cdot 10^{-4}$			
AA		20 m	1967		165 m	$4 \cdot 10^{-4}$	70 d (theor)		
AB		20 m	1967		100 m	$3,6 \cdot 10^{-4}$	50 d (theor)		
AC		20 m	1967		100 m	$3,9 \cdot 10^{-4}$	50 d (theor) 26 d (Uranin)		
AD	Tiefenbrunnen	70 m						kein	

Die SMX-Konzentrationen lagen im Main zwischen 40 ng/l und 70 ng/l (Abschnitt Limbach bis Schweinfurt), in der Regnitz vor der Kläranlage (KA) Erlangen bei 75 ng/l und nach der KA bei 100 ng/l. In der Fränkischen Rezat wurden Werte bis 190 ng/l gemessen (Abb. 26). Als Hauptbelastungsquelle der Fränkischen Rezat ist wahrscheinlich die KA Ansbach zu nennen, aber selbst kleine Anlagen wie die KA Wassermungenau verursachen aufgrund der geringen Wasserführung der Rezat eine deutliche Erhöhung der SMX-Konzentrationen im Gewässer. Die SMX-Konzentrationen der untersuchten Brunnen lagen bei der zweiten Beprobung teilweise erheblich unter den Werten der ersten Beprobung. Ein derartig ausgeprägter Unterschied war bei keinem anderen gemessenen Spurenstoff zu beobachten (siehe Anhang 1 und Anhang 2). Die SMX-Konzentrationen der von Oberflächenwasser beeinflussten Brunnen lagen i.d.R. unter den Werten der benachbarten Fließgewässer. Wie von Jekel und Grünheid (2007) beschrieben, tritt während der Uferfiltratpassage eine teilweise Elimination von SMX auf, in der Größenordnung von 50 % unter aeroben und 80 % unter anaeroben Bedingungen. Teilweise lagen die Brunnen- und Rohwasserkonzentrationen über den aktuellen Werten des Mains, d.h. die Wasserbeschaffenheit der Brunnen spiegelt einen zeitlich zurückliegenden (ca. 50-100 Tage) Belastungszustand des Fließgewässers wider. Der Hauptmetabolit Ac-SMX wurde in den Gewässern nur in niedrigen Konzentrationen bis max. 50 ng/l (Fränkische Rezat) gefunden. In den Brunnen lagen die Werte durchweg unter der Bestimmungsgrenze von 2 ng/l.

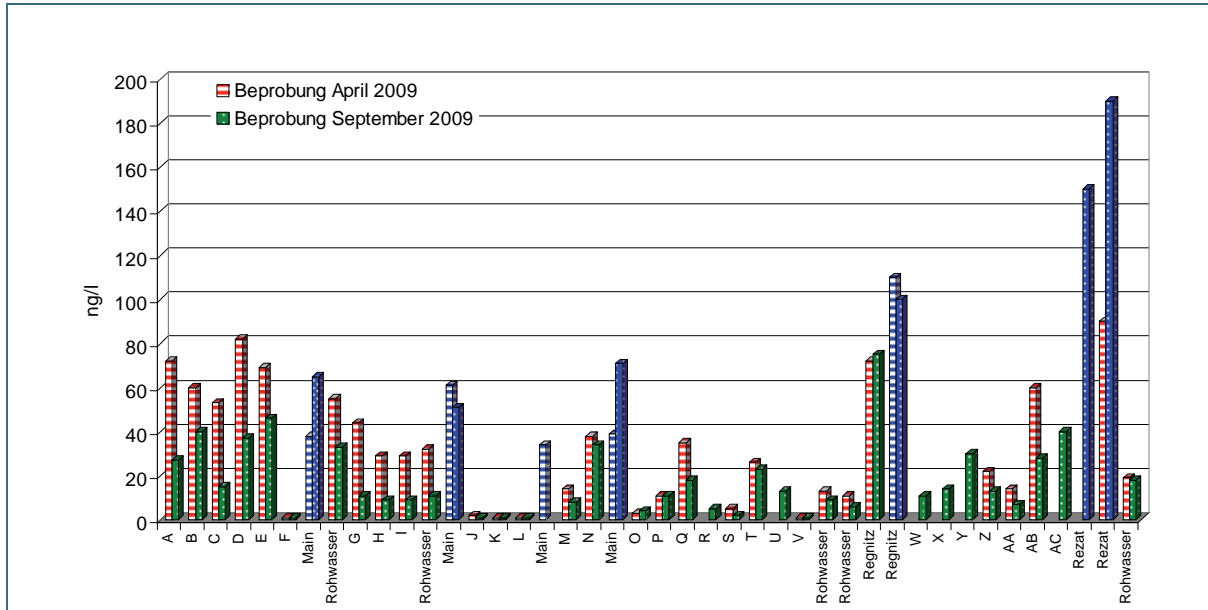


Abb. 26: Sulfamethoxazol-Konzentrationen in Flüssen, Brunnen und Rohwasser (anonymisiert)

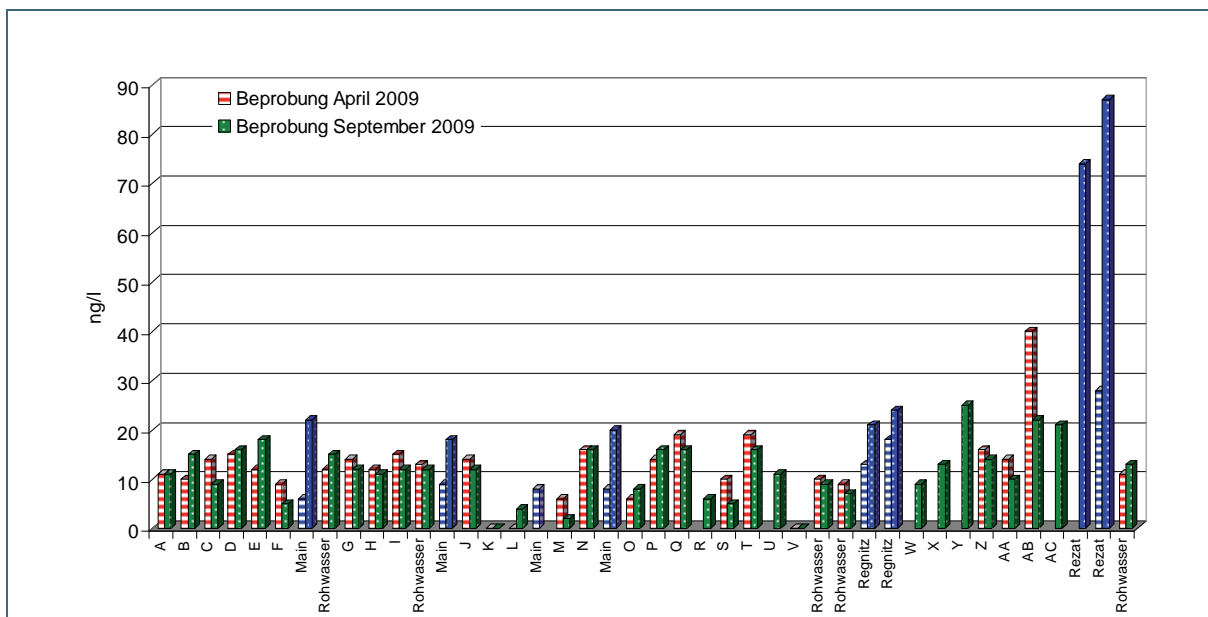


Abb. 27: Primidon-Konzentrationen in Flüssen, Brunnen und Rohwasser (anonymisiert)

Die Belastung der untersuchten Gewässer mit Primidon war bei der September-Beprobung deutlich ausgeprägter als im April (Abb. 27). Die mit Abstand höchsten Werte (bis zu 87 ng/l) wurden in der Fränkischen Rezat gemessen. Im April lagen die Konzentrationen in den Brunnen und Rohwässern teilweise über den Werten der Fließgewässer. Nach Drewes et al. (2003) wird Primidon bei künstlicher Grundwasseranreicherung selbst bei einer Sickerdauer bis zu acht Jahren weder aerob noch anaerob eliminiert. Wie auch bei den anderen Arzneimittelwirkstoffen ersichtlich, ist die Belastung der Brunnen mit geringem Uferfiltratanteil (Tab. 7) vergleichsweise deutlich geringer. Der Metabolit PEMA verhält sich während der Uferfiltratpassage wie der Ausgangsstoff Primidon, insgesamt sind die gemessenen Konzentrationen in Gewässern und Brunnen etwas niedriger (Abb. 28).

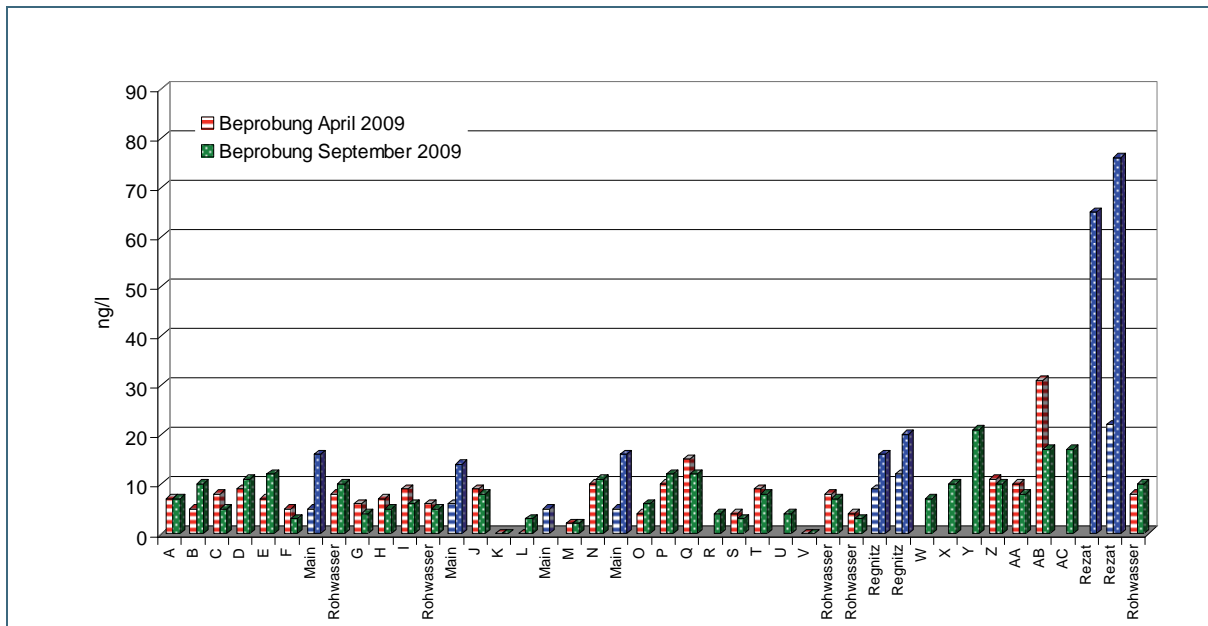


Abb. 28: PEMA-Konzentrationen in Flüssen, Brunnen und Rohwasser (anonymisiert)

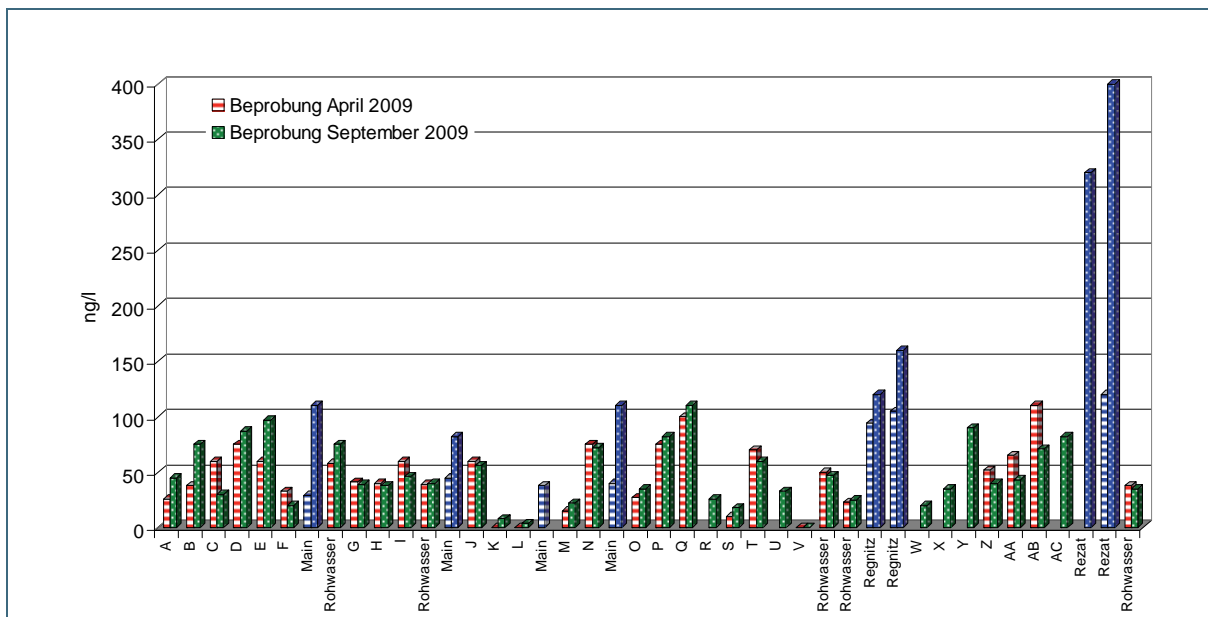


Abb. 29: Carbamazepin-Konzentrationen in Flüssen, Brunnen und Rohwasser (anonymisiert)

Carbamazepin wurde im Main in Konzentrationen von ca. 40 ng/l (April) bis 70 ng/l (September) gefunden (Abb. 29). Dieser ausgeprägte jahreszeitliche Unterschied kann nicht alleine mit variierenden Pegelständen im Fluss (Verdünnungseffekt) erklärt werden (vgl. Tab. 7). An der Fränkischen Rezat haben sich die CBZ-Werte im Vergleich April / September sogar mehr als verdreifacht (max. 400 ng/l), während die Abflussmenge um lediglich 40 % zurückging. Diese jahreszeitlichen Unterschiede spiegeln sich nicht in den CBZ-Konzentrationen der Brunnen wider. Insgesamt wurde an zwei Brunnen die Konzentration von 0,1 µg/l überschritten, die Rohwasserwerte waren jedoch deutlich geringer.



Zum Teil lagen die Brunnen- und Rohwasserkonzentrationen - wie auch bei den anderen Arzneimitteln beobachtet - über den aktuellen Werten des Mains, was mit der Fließdauer während der Untergrundpassage erklärt werden kann (keine korrespondierende Probennahme). Weiter ergibt sich der Hinweis, dass unter gegebenen hydrogeologischen Umständen das Rückhaltevermögen des Bodens gegenüber polaren Spurenstoffen gering ist. Die unterschiedlichen Belastungen der Brunnen sind in der Regel weniger auf die Entfernungen Brunnen-Fließgewässer zurückzuführen als vielmehr auf die Fließdauer und den Uferfiltratanteil (vgl. Tab. 7).

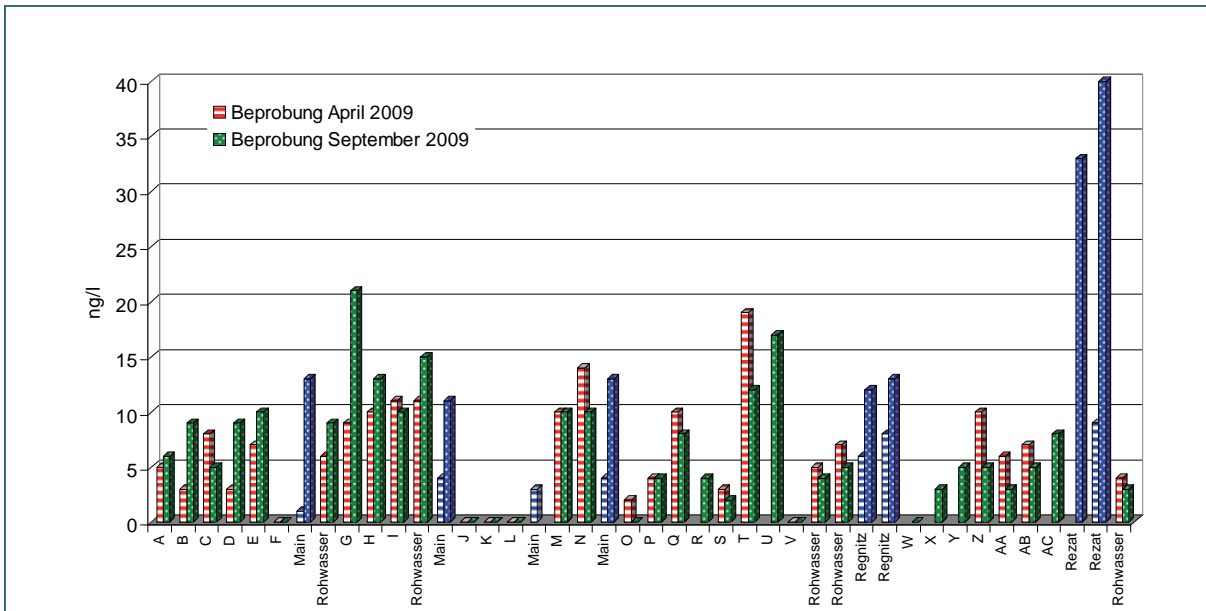


Abb. 30: CBZ-Epoxid-Konzentrationen in Flüssen, Brunnen und Rohwasser (anonymisiert)

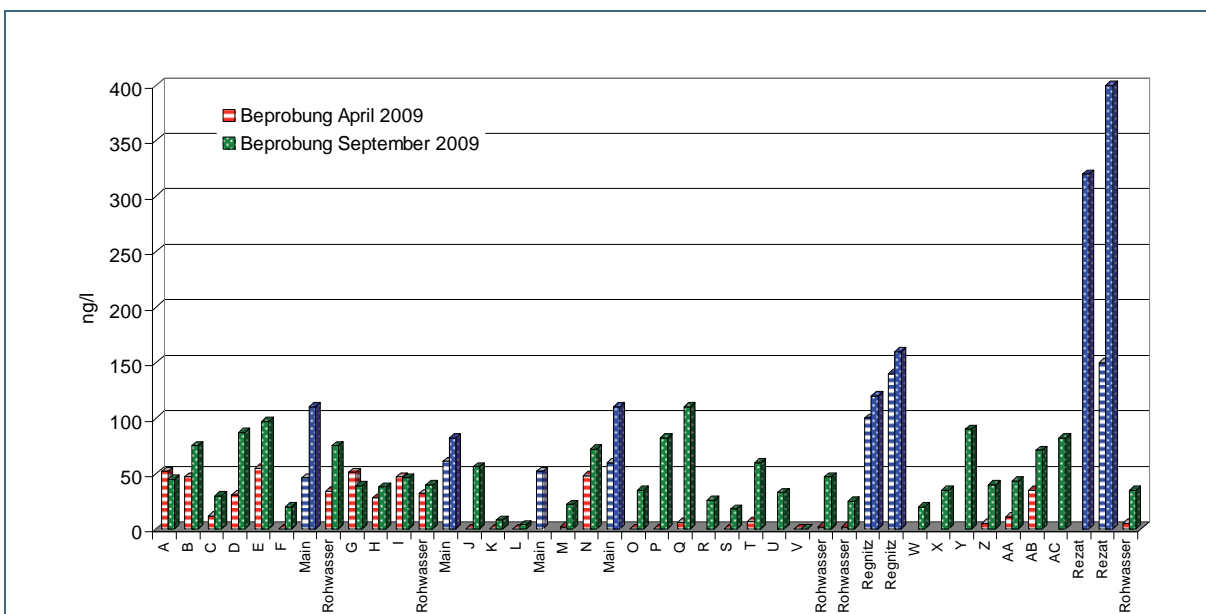


Abb. 31: CBZ-DiOH-Konzentrationen in Flüssen, Brunnen und Rohwasser (anonymisiert)

Die CBZ-Epoxid-Konzentrationen lagen in den untersuchten Fließgewässern um ca. Faktor 10 unter den Werten der Ausgangssubstanz CBZ (Abb. 30). Auch in den Brunnen war dieser Trend zu beobachten, die Spannweite erstreckte sich jedoch von Faktor 2 bis 25, ohne irgendwelche Standorteinflüsse erkennen zu lassen. Die Konzentrationsverläufe von CBZ-Epoxid zeigten in den einzelnen

Brunnenfeldern ähnliche Tendenzen wie im Falle des CBZ.

Während in Kläranlagenabläufen das Verhältnis CBZ/CBZ-DiOH (10,11-Dihydro-10,11-dihydroxycarbamazepin) bei ca. 1:4 liegt (vgl. Tab. 2), wurde in den untersuchten Fließgewässern lediglich ein Verhältnis von maximal 1:2 registriert (Abb. 31). In den Brunnen lagen die CBZ-DiOH-Konzentrationen mit wenigen Ausnahmen sogar deutlich unter den CBZ-Werten. Dies deutet im Gegensatz zu den Beobachtungen aus den Säulenversuchen auf ein vergleichsweise besseres Abbau- bzw. Sorptionsverhalten von CBZ-DiOH im Gewässer und im Aquifer hin. Im September lagen die Konzentrationen an CBZ-DiOH in den Fließgewässern um ca. Faktor 2 über den Aprilwerten. Die höchste Belastung wurde mit 740 ng/l in der Fränkischen Rezat gemessen, in den Brunnen wurde dagegen der 100 ng/l-Wert nicht überschritten.

Vom Röntgenkontrastmittel Amidotrizoesäure wurden 2001 60 t an Krankenhäuser und lediglich 1 t an Apotheken verkauft. Dieser Wirkstoff ist gut nierengängig und wird in kurzer Zeit wieder unverändert ausgeschieden. Im Zuge des Klärprozesses findet kein wesentlicher Abbau oder Rückhalt über Adsorption statt. Entsprechend deutlich ist die zunehmende Belastung im Gewässer nach Kläranlageneinleitungen zu erkennen (vgl. Regnitz bzw. Rezat; Abb. 32). Von allen untersuchten Arzneimittelwirkstoffen erreichte die Amidotrizoesäure sowohl in den Fließgewässern (max. 4800 ng/l) als auch in den Brunnen (max. 650 ng/l) die höchsten Werte. Eine mögliche Gefährdung der Brunnen durch das stark belastete Wasser der Fränkischen Rezat im September (Fließdauer im Untergrund ca. 50 Tage) kann mit dem bestehenden Datenmaterial nicht abgeschätzt werden. In Brunnen mit geringem Uferfiltratanteil lagen dagegen die Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze von 50 ng/l.

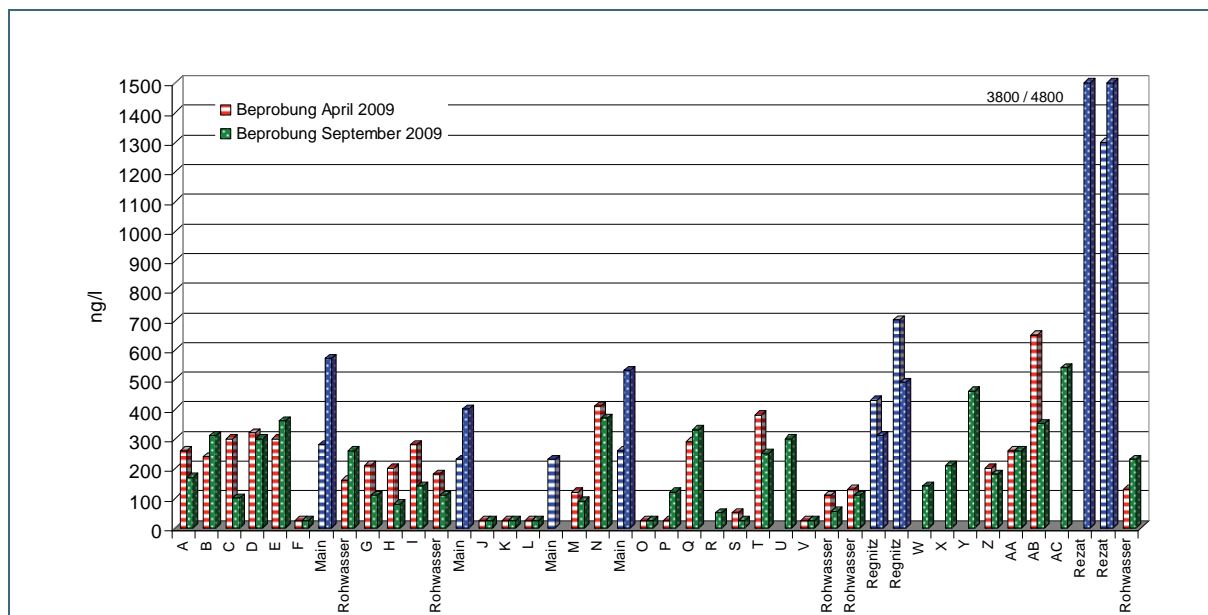


Abb. 32: Amidotrizoesäure-Konzentrationen in Flüssen, Brunnen und Rohwasser (anonymisiert)

### Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Oberflächengewässer- und Brunnenbeprobung

Die Mehrzahl der beprobten Brunnen weist einen maßgeblichen Uferfiltratanteil auf. Die Stoffkonzentrationen der von Oberflächenwasser beeinflussten Brunnen liegen weitgehend in der Größenordnung der benachbarten Fließgewässer. Dies bedeutet, dass bei einer Fließdauer von etwa 30-200 Tagen keine wesentliche Elimination der untersuchten Stoffe im Untergrund stattfindet. Teilweise liegen die Stoffkonzentrationen in den Brunnen über den aktuellen Werten der Flüsse, d.h. die Wasser-

beschaffenheit der Brunnen spiegelt einen zeitlich zurückliegenden Belastungszustand der Fließgewässer wider. Brunnen mit geringem Uferfiltratanteil weisen vergleichsweise niedrigere Konzentrationen an Arzneimitteln, Benzotriazolen und Phosphorsäuretriestern auf (siehe Anhang 1 bis Anhang 3). Allerdings steigen in diesen Brunnen die Werte der aus dem Rübenanbau stammenden Chloridazonmetaboliten deutlich an. Keine messbaren Belastungen mit Ausnahme von Acesulfam liegen dagegen in den tieferen Brunnen vor.

### Vergleich der Ergebnisse aus Säulenversuchen und Freilandbeprobung

Gemäß den aus den Säulenversuchen gewonnenen Ergebnissen ist das Rückhaltevermögen des Bodens gegenüber Primidon, PEMA sowie CBZ-DiOH gering. Sulfamethoxazol, Carbamazepin und CBZ-Epoxid werden dagegen in den Boden- und Aquifersäulen zum größten Teil zurückgehalten. In der Realität ist jedoch nur eine geringe Elimination der untersuchten polaren Spurenstoffe während der Uferfiltratpassage zu erkennen.

Zum Verhalten von CBZ im Wasser-Sediment-System existieren widersprüchliche Angaben. Während einige Autoren der Substanz aufgrund des  $K_{ow}$ -Wertes von 280 eine gewisse Sorptionsneigung attestieren, lässt die geringe Elimination des Stoffes während der Abwasserreinigung oder der Uferfiltration auf eine hohe Mobilität schließen (z.B. Heberer et al., 2002). Der niedrige Sorptionskoeffizient  $K_d$  von 1,2 l/kg (Ternes et al., 2004) deutet ebenfalls auf eine hohe Mobilität im Boden hin. Löffler et al. (2005) geben an, dass der Hauptmetabolit 10,11-Dihydro-10,11-dihydroxy-CBZ (CBZ-DiOH) aufgrund seiner deutlich erhöhten Polarität kaum am Sediment sorbiert. Mersmann (2003) spricht von einer Aufeinanderfolge von Adsorption und Desorption bzw. einer Verzögerung der Freisetzung in Böden, so dass der Wirkstoff auch einige Zeit nach dem Eintrag in das Grundwasser gelangen kann. Je höher dabei der organische Gehalt der Böden, desto eher wird der Stoff zurückgehalten. Ternes und Römbke (2005) wiesen in Säulenversuchen mit verschiedenen Bodentypen eine gewisse Immobilität von CBZ nach. Auch Oppel et al. (2004) stellten in Säulenversuchen ein geringes Auswaschungspotenzial von CBZ fest. Allerdings bestehen auch hier Zweifel, die nicht zuletzt durch den mehrfachen Nachweis von CBZ im Grundwasser und im Uferfiltrat gestützt werden. Als mögliche Ursachen für diesen Widerspruch geben die Autoren an, dass die Säulenversuche mit Bodenmaterial durchgeführt wurden, während eine Grundwasserkontamination in der Realität durch Infiltration belasteter Wässer durch Flusssedimente und Unterböden erfolgt. Diese Erklärung trafe somit auf die eigenen Versuche mit ungesättigten Bodensäulen zu. Es kann damit jedoch nicht der starke Rückhalt von CBZ in den gesättigten Aquifersäulen mit ungestörten Flusssedimenten erklärt werden.

Der geringe Rückhalt des Bodens gegenüber den untersuchten Stoffen während der Uferfiltratpassage (Oberflächengewässer-Brunnen) ist wahrscheinlich auf die lange Kontaktzeit des Bodens mit den entsprechenden Substanzen zurückzuführen. So liegen Arzneimittelwirkstoffe wie z.B. CBZ schon seit über 40 Jahren in der Umwelt vor, d.h. die Sorptionsflächen im Boden sind über diesen langen Zeitraum aufgesättigt worden. Im Gegensatz dazu wird in Säulenversuchen i.d.R. unbelasteter Boden eingesetzt, der noch die vollen Sorptionseigenschaften besitzt.

### 3.3 Bewertung

Die Abbautests ergaben, dass **Sulfamethoxazol** und seine humanen Metaboliten sehr gut biologisch abbaubar sind. Dabei wird beim Abbau der humanen Metaboliten die Muttersubstanz SMX zurückgebildet, was in realen Kläranlagen bestätigt wurde. Im Zuge des weiteren Abbaus von SMX, Ac-SMX und Glu-SMX wird in Standardexperimenten das stabile Abbauprodukt 3-Amino-5-methyl-isoxazol gebildet, dessen Auftreten in Realität jedoch nicht nachgewiesen werden konnte.

Trotz der guten biologischen Abbaubarkeit von SMX findet sich die Substanz wegen der hohen Verbrauchsmengen in signifikanten Mengen im Gewässer. Im Oberflächengewässer liegen die Konzentrationen von SMX meist unterhalb von 0,1 µg/l. Der Metabolit Ac-SMX findet sich in Konzentrationen bis 0,02 µg/l. Die SMX-Messwerte sind um den Faktor 300 kleiner als die niedrigste bekannte Effektkonzentration von 30 µg/l im Phototoxizitätstest. Die für SMX ermittelte PNEC (predicted no effect concentration) liegt mit einem Wert von 0,3 µg/l (Sicherheitsfaktor 100; vgl. Anhang 4) ebenfalls noch über der Gewässerkonzentration. Eine weitere im Auftrag der LAWA (2005) abgeleiteter Umweltqualitätsnorm-Vorschlag für aquatische Lebensgemeinschaften liegt mit einem Wert von 0,15 µg/l jedoch bereits im Konzentrationsbereich der untersuchten Fließgewässer. Somit ist in stark belasteten Gewässern v.a. nach Kläranlageneinleitungen eine ökotoxikologische Gefährdung durch Sulfonamide nicht auszuschließen.

Wie Nachweise in ufernahen Brunnen jedoch zeigen, wird Sulfamethoxazol durch die Passage im Untergrund nur unter bestimmten Bedingungen und auch nicht vollständig zurückgehalten und gelangt damit potentiell ins Grundwasser. In den Brunnen wurden sogar teilweise höhere Konzentrationen als im infiltrierenden Oberflächengewässer gemessen, was durch die Fließdauer im Untergrund erklärt werden kann (keine korrespondierende Probennahme). Da ohne weitere Trinkwasseraufbereitung ggf. auch mit entsprechenden Konzentrationen im Reinwasser zu rechnen ist, kann eine Kontamination des Trinkwassers mit SMX erfolgen.

Die Verfrachtung von SMX mit dem Sickerwasser ins Grundwasser wurde in Säulen- und Lysimeterversuchen bestätigt. Hingegen wurde der SMX-Metabolit Ac-SMX nicht verfrachtet und ist auch nicht in ufernahen Brunnen nachweisbar.

Das Antiepileptikum **Carbamazepin** ist biologisch nicht abbaubar. Auch der humane Hauptmetabolit CBZ-DiOH zeigt nur eine geringe Elimination von ca. 25 %. Die gemessenen Konzentrationen im Kläranlagenablauf liegen bei 1 µg/l für Carbamazepin, während die Konzentrationen von CBZ-DiOH etwa doppelt so hoch sind. Dieses Konzentrationsverhältnis findet sich auch im Oberflächengewässer mit bis zu 0,4 µg/l CBZ und bis zu 0,75 µg/l CBZ-DiOH wieder. Für Carbamazepin werden Vorschläge zu PNEC-Werten im Bereich von 0,5 µg/l bis 17 µg/l genannt (siehe 3.1.1), was den gemessenen Konzentrationen in den Flüssen sehr nahe kommt.

In den Säulen- und Lysimeteruntersuchungen zeigt Carbamazepin nur eine sehr geringe Mobilität. Trotzdem wird es regelmäßig im Grundwasser nachgewiesen. Laut Literatur kann dieser Widerspruch möglicherweise auf die unterschiedlichen Sorptionseigenschaften der in den Versuchen verwendeten Böden und des realen Aquifers zurückgeführt werden. Dies erklärt jedoch nicht den starken Rückhalt von CBZ in den gesättigten Aquifersäulen mit ungestörten Flusssedimenten. Als Hauptgrund für die abweichenden Ergebnisse aus Labor- und Freilanduntersuchungen sind wahrscheinlich die unterschiedlich langen Belastungszeiten und damit Aufsättigungszeiten der Böden mit Arzneimittelwirkstoffen zu nennen. Diese liegen im Labor in der Größenordnung von Monaten, in der Realität wie am Beispiel des CBZs bei etwa 40 Jahren. Gerade in Hinblick auf die nachgewiesene hohe Persistenz und Ökotoxizität sollte das Auftreten dieses Wirkstoffs unbedingt weiter untersucht und sein Transport ins Grundwasser mit unterschiedlichen Bodenmaterialien eindeutig geklärt werden. Zudem wurde gezeigt, dass der Hauptmetabolit CBZ-DiOH ebenfalls in das Grundwasser infiltriert, was zu Konzentrationen in ufernahen Brunnen bis zu 0,1 µg/l führt. Aus der ubiquitären Verbreitung des Metaboliten folgt, dass sein Gefährdungspotenzial unbedingt geklärt werden muss.

Zur biologischen Abbaubarkeit des Antiepileptikums **Primidon** und seines humanen Metaboliten **PEMA** gibt es in der Literatur widersprüchliche Angaben. Die in diesem Projekt ermittelten Abbaudaten leisten einen Beitrag zur Klärung dieses Sachverhalts. Weder Primidon noch PEMA erfüllen die Kriterien zur leichten bzw. potenziellen biologischen Abbaubarkeit und wurden auch in den Laborkläranlagen nicht signifikant eliminiert. Die mittlere Elimination in der realen Kläranlage war mit 20-30 %

ebenfalls gering. Es kann davon ausgegangen werden, dass Primidon und PEMA biologisch schlecht abbaubar sind.

Hingegen konnte die in der Literatur beschriebene hohe Mobilität von Primidon und PEMA sowohl in den Säulen- als auch in den Lysimeterversuchen bestätigt werden. Beide Substanzen wurden nach wenigen Wochen in den Bodensäulen nicht mehr zurückgehalten. Folgerichtig wurden beide Stoffe sowohl in Oberflächengewässern als auch in den untersuchten Uferfiltratsbrunnen in mittleren Konzentrationen von 10-20 ng/l nachgewiesen. Damit sind Primidon und PEMA auf jeden Fall als potenzielle Grundwasserkontaminanten einzustufen.

In der Literatur liegen für den Metaboliten **Ritalinsäure** weder Daten zum Verhalten bei der Abwassertreinigung noch zum Auftreten in Gewässern vor. Weiter gibt es keine Kenntnisse zur Ökotoxizität. Nach eigenen Untersuchungen wird Ritalinsäure in der realen Kläranlage mit einer mittleren Elimination von 16 % kaum abgebaut. In Main und Regnitz wurden Konzentrationen von 5 ng/l bis 23 ng/l gemessen, in der Fränkischen Rezat wurden Werte bis 23 ng/l erreicht. Die Belastung der uferfiltratbeeinflussten Brunnen lag im Bereich der Bestimmungsgrenze von 2 ng/l. Nachdem die Muttersubstanz Ritalin erst in den letzten Jahren in größeren Mengen verschrieben wurde (siehe 3.1.4.), dürfte Ritalinsäure in den Flüssen im genannten Konzentrationsbereich erst seit kurzer Zeit auftreten. Somit ist mit einer möglichen Abnahme der Sorption im Aquifer ein künftiger Anstieg der Konzentrationen in den Brunnen nicht auszuschließen. Aufgrund der stark ansteigenden Verschreibungsmengen von Ritalin sollte das Gefährdungspotenzial des Metaboliten unbedingt geklärt werden.

**Stoffübergreifend** lassen sich folgende Kernaussagen festhalten:

- Die Konzentrationen der Metaboliten in Kläranlagen, Oberflächengewässern und im Uferfiltrat liegen meist in der gleichen Größenordnung wie die der Wirkstoffe selbst.
- Auch hinsichtlich der Abbaubarkeit zeigen die Metaboliten keine deutliche Verbesserung im Vergleich zu den Muttersubstanzen; die Muttersubstanzen werden teilweise beim biologischen Abbau wieder zurückgebildet.
- Durch die Metabolisierung der Arzneimittel steigert sich nicht der Rückhalt im Boden, wodurch Metaboliten wie auch Muttersubstanzen partiell auch ins Grundwasser verfrachtet werden.

Hinsichtlich des Auftretens, Abbaus und der Verteilung zeigen humane Arzneimittelmetaboliten ein ähnliches Verhalten wie die Arzneimittel selbst. Somit ist auch bei den Arzneimittelmetaboliten von einer eindeutigen Umweltexposition auszugehen. Wie hoch die Gefährdung der Umwelt durch die Arzneimittelmetaboliten ist, kann aufgrund fehlender Daten zur Ökotoxizität nicht geklärt werden.

## 4 Mikrobiologische und molekularbiologische Untersuchungen zum Abbau von Sulfamethoxazol

### 4.1 Einleitung

Arzneimittel sind daraufhin entwickelt, einen biologischen Effekt zu zeigen. Daher gebührt ihnen besondere Aufmerksamkeit im Hinblick auf ihre Risikobewertung für die Umwelt (Fent et al., 2006). Monitoring-Programme zeigen, dass Arzneimittel oder ihre Metaboliten heute überwiegend über den Weg Abwasser, Kläranlagenablauf bzw. Klärschlamm, aber auch aus Mülldeponien (Daughton und Ternes, 1999) in die Umwelt gelangen. Mittlerweile sind sie in allen Umweltkompartimenten nachzuweisen, im aquatischen Raum im ng/l- bis µg/l-Bereich (z.B. Heberer, 2002b; Kümmerer, 2008; Ternes und Joss, 2007). Für ausgewählte Einzelsubstanzen liegen auch zu Elimination und Ökotoxikologie Daten vor, die meist über normierte Testverfahren ermittelt wurden (vgl. Kap. 3.2). Da die Versuchsbedingungen wie Biomassekonzentration, Schlammbelastung, Temperatur, Redoxpotential und Testdauer oft weit von den realen Verhältnissen entfernt sind, bieten diese Studien jedoch nur bedingt belastbare Aussagen über Abbaupotential und Stoffverteilung in der Umwelt (Baran et al., 2006; Ingerslev und Halling-Sørensen, 2000; Kümmerer et al., 2004; Perez et al., 2005).

Eine der wichtigsten Wirkstoffgruppen, sowohl vom Anwendungsbereich, den Verbrauchsmengen, als auch den möglichen Folgen ihres Eintrags in die aquatische Umwelt sind Antibiotika. Wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, gelangen sie als Wirksubstanz, als Konjugate, die unter Freisetzung der Wirksubstanz von Organismen wieder gespalten werden können (z.B. Glucuronide, acetylierte Derivate) oder als andere Metaboliten mit Urin oder Fäzes ins Abwasser (z.B. Sulfamethoxazol, Makrolide, Göbel et al., 2007). Aufgrund ihres Wirkmechanismus ist nicht auszuschließen, dass sie Zusammensetzung und/oder Wachstumsverhalten mikrobieller Biozönosen beeinflussen. Weiter stellt die Bildung von Resistenzen bzw. die Weitergabe Plasmid-gebundener Resistenzgene durch horizontalen Gentransfer an Umweltbakterien ein nicht unerhebliches Risiko dar (Agerso und Petersen, 2007; Witte, 2004). Zudem werden Antibiotika als Induktoren für die inter-organismische Kommunikation diskutiert (Fajardo und Martínez, 2008).

Innerhalb der Antibiotika wurde gezeigt, dass schlecht adsorbierende Substanzen wie Sulfonamide bis in die Wasserkompartimente Uferfiltrat/Grundwasser durchschlagen können (Schmidt und Brauch, 2006). Daher wurde im vorliegenden Projekt für mikrobiologische Untersuchungen zum Arzneimittel-Abbau das Sulfonamid-Antibiotikum Sulfamethoxazol (SMX) als Modellsubstanz ausgewählt, um dessen Abbauverhalten und -potential durch abwasserbürtige Biozönosen zu klären.

Der Einfluss von Sulfonamiden direkt auf Abwasserbiozönosen, z.B. dadurch bedingte Populationsverschiebungen in Richtung SMX-abbauende Biozönosen und Adaptionen, ist bisher kaum untersucht. Perez et al. (2005) wiesen für hoch belasteten Belebtschlamm gute Eliminationsraten nach. Kreuzinger et al. (2004) zeigten, dass hydraulische Aufenthaltszeit sowie Schlammalter von Hochlastanlagen oft zu kurz für einen nennenswerten Abbau sind. Weiter ist oft weniger das Schlammalter ausschlaggebend für einen besseren Abbau als vielmehr eine "höhere Aktivität" der Biomasse (Göbel et al., 2007). Darüber hinaus kann auch eine unausgewogene Abwasserzusammensetzung mit Kohlenstoff- und/oder Stickstoffmangel dazu führen, dass SMX einem Abbau zugänglich wird. Es dient dabei offensichtlich als Kohlenstoff- und/oder Stickstoffquelle (Drillia et al., 2005a).

All den bisherigen Untersuchungen ist gemein, dass nur eine "Elimination", nicht ein Abbau von Sulfonamiden nachgewiesen wurde. Weiter wurde der Einfluss wichtiger Humanmetaboliten, insbesondere der häufig auftretenden acetylierten Formen der Ausgangssubstanz nicht berücksichtigt.

Erstes Ziel der vorliegenden mikrobiologischen Untersuchungen war es, das Auftreten sowie die Ausbreitung von SMX und dessen Metaboliten in verschiedenen Kläranlagenkompartimenten nachzuweisen, um den Einfluss der einzelnen Behandlungsstufen zu prüfen. Zur Ermittlung des Eliminationsverhaltens von SMX wurden modellhaft kommunale Kläranlagen mit zwei unterschiedlichen Verfahren ausgewählt: eine zweistufige Belebungsanlage sowie eine Membranbelebungsanlage. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Ermittlung sowohl der biologischen als auch der physikalischen Elimination (Sorption). Die Analytik hierzu wurde von Ref. 75 des LfU, vom Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft der TU München, vom Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene der Universitätsklinik Freiburg bzw. vom Labor Wilhelm, Schrobenhausen, durchgeführt.

Nächstes Ziel war es, aus der hochaktiven Biozönose der ersten Stufe der zweistufigen Anlage eine Anreicherungskultur zu gewinnen, die nicht nur Aufschluss über die potentielle SMX-Elimination geben sollte, sondern auch über die Bildung von Metaboliten durch bakterielle Aktivitäten. Über Populationsanalysen der beteiligten Bakterien sollten durch mikrobiologische und molekularbiologische Untersuchungen Leit- und Indikatororganismen für den SMX-Abbau ermittelt und nach Möglichkeit auch taxonomisch eingeordnet werden. Gezielte Abbauversuche mit diesen Organismen als Konsortium sollten erste Aussagen zum SMX-Abbauverhalten unter definierten Umweltbedingungen liefern.

Schließlich sollten erste Untersuchungen zum Auftreten bekannter Sulfonamid-Resistenzgene in verschiedenen Kläranlagen-Kompartimenten Aufschluss über die Risiken eines Eintrags in die Umwelt geben.

## 4.2 Material und Methoden

### 4.2.1 Beprobung von Kläranlagen

Für ein Screening von Arzneimitteln sowie von Sulfonamid-Resistenzgenen wurden zwei kommunale Kläranlagen ausgewählt: eine konventionelle zweistufige Belebungsanlage (KBA-M2) und eine einstufige Membranbelebungsanlage (MBA-MH). Die konventionelle Belebungsanlage KBA-M2 mit 1 Mio. EW besteht aus einer Hochlaststufe (BTS = 0,64 kg BSB<sub>5</sub>/kg\*d, Kohlenstoffelimination mit vorgeschalteter Denitrifikation) und einer Niedriglaststufe (BTS = 0,02-0,05 kg BSB<sub>5</sub>/kg\*d, Nitrifikation). Die einstufige Membrananlage MBA-MH mit 9.700 EW (BTS < 0,15 kg BSB<sub>5</sub>/kg\*d, intermittierende Nitrifikation/Denitrifikation) ging 2003 in Betrieb und war zu diesem Zeitpunkt die größte MBA in Deutschland (Bleisteiner et al., 2006). Die Trenngrenze der eingesetzten Membranen beträgt 0,2 µm zum theoretischen Rückhalt möglichst aller Feststoffe, aller Bakterien und der meisten Viren. Von beiden Anlagen wurden Rohabwasser sowie Zu- und Abläufe der Belebungsbecken als 24 h-Mischproben und Belebtschlämme als Stichproben untersucht (4 Probenahmetage: Februar 2007, Februar/März 2008, Juli/August 2008 und September/Okttober 2008).

### 4.2.2 Batch-Versuche

Für den Nachweis eines Abbaus von SMX kamen Batch-Versuche im semikontinuierlichen "fill and draw"-Verfahren mit einem Volumen von 1,5 l und einer Biomassekonzentration von 0,2 bis 0,3 g TS/l mit je 2 Parallelen für zwei Ansätze mit verschiedenen SMX-Konzentrationen sowie eine Kontrolle ohne SMX-Zugabe zum Einsatz. Die Animpfung erfolgte mit Hochlast-Belebtschlamm der KBA-M2. Als synthetisches Medium diente das im Zahn-Wellenstest (DEV, 2000) verwendete Nährmedium mit zusätzlich 0,1 ml/l einer Spurenelementlösung nach Hoagland. Als Kohlenstoffquelle wurde im Kontrollansatz 1a/b Acetat zugesetzt. In den Versuchsansätzen 2a/b und 3a/b wurde in der Adaptionsphase Acetat und als Cosubstrat SMX in verschiedenen Konzentrationen angeboten (Tab. 8). Als Stickstoffquelle diente Ammoniumnitrat. In der zweiten Versuchsphase wurde in 2a/b die SMX-Konzentration erhöht und in 3 a/b SMX als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle angeboten. Die Versuchsansätze wurden unter aeroben Bedingungen (7-8 mg/l O<sub>2</sub>), bei 24 bis 26°C im Dunkeln über 10 Wochen

(Adaptionsphase 1 = 6 Wochen, Versuchsphase 2 = 4 Wochen) inkubiert. Für die chemische Analytik (SMX und DOC) wurde 2-mal pro Woche nach 30 min Schlammsedimentation 200 ml Überstand entnommen und 200 ml Nährmedium zugegeben. Konzentrationsangaben für Acetat, SMX und Ammoniumnitrat bei Versuchsbeginn und die zudosierten Konzentrationen der einzelnen Stoffe während der beiden Versuchsphasen sind in Tabelle 8 aufgelistet. Gegen Ende der Versuchsphase wurden zusätzlich zu den Proben der Wasserphase auch Schlammproben der Ansätze 2 und 3 für SMX-Analytik eingefroren. Zusätzlich wurden mit diesen Schlämmen Kultivierungsversuche durchgeführt mit dem Ziel, Isolate von SMX abbauenden Mikroorganismen zu gewinnen. Mit molekularbiologischen Untersuchungen wurden Schlämme von allen drei Versuchsansätzen am Ende der Adaptionsphase und am Ende der Versuchsphase im Hinblick auf eine Adaption der Belebtschlamm-Biozönose analysiert.

Tab. 8: Dosierung von Acetat (Na-Ac) und SMX bzw. Ammoniumnitrat während der Versuchsphasen 1 und 2 (Zugabe Nährmedium 2x/Woche, Konzentrationen in mg/l)

	Kontrollansatz 1a/1b			Ansatz 2a/2b			Ansatz 3a/b		
	Acetat-C	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> -N	SMX	Acetat-C	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> -N	SMX	Acetat-C	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> -N	SMX
<b>Adaptionsphase 1 Start</b>	88	2,6	0	88	2,6	10 = 4,7 mg C/l = 1,7 mg N/l	88	2,6	10 = 4,7 mg C/l = 1,7 mg N/l
<b>1. - 2. Woche</b>	11,7	0,35	0	11,7	0,35	1,3 = 0,6 mg C/l = 0,2 mg N/l	11,7	0,35	1,3 = 0,6 mg C/l = 0,2 mg N/l
<b>3. - 6. Woche</b>	11,7	0,35	0	11,7	0,35	1,3 = 0,6 mg C/l = 0,2 mg N/l	11,7	0,35	12 = 5,6 mg C/l = 2,0 mg N/l
<b>Versuchsphase 2 Start</b>	88	2,6	0	88	2,6	10 = 4,7 mg C/l = 1,7 mg N/l	0	0	50 = 23,5 mg C/l = 8,3 mg N/l
<b>1. - 2. Woche</b>	19,4	0,35	0	19,4	0,35	10 = 4,7 mg C/l = 1,7 mg N/l	0	0	19 = 8,9 mg C/l = 3,1 mg N/l
<b>3. - 4. Woche</b>	19,4	0,35	0	19,4	0,35	10 = 4,7 mg C/l = 1,7 mg N/l	0	0	50 = 23,5 mg C/l = 8,3 mg N/l

## 4.2.3 Chemische Analytik

### 4.2.3.1 DOC-Messungen

Die wässrigen Proben wurden über einen Membranfilter (Porengröße 0,45 µm) filtriert. Die Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffes (DOC) erfolgte nach EN 1484 DEV H3 (DEV, 2000).

### 4.2.3.2 Sulfamethoxazol (SMX), N-Acetyl-Sulfamethoxazol (Ac-SMX) sowie die Metaboliten 3-Amino-5-methyl-isoxazol, 3-Amino-isoxazol und Isoxazol

Die Quantifizierung von SMX, seines Human-Metaboliten Ac-SMX sowie des Metaboliten 3-Amino-5-methyl-isoxazol in wässrigen Proben erfolgte im Ref.75 des LfU mit Hilfe der LC-MS/MS ohne vorherige Anreicherung. Die Nachweisgrenze liegt bei 50 ng/l. Die Analytik der beiden Substanzen 3-Amino-isoxazol und Isoxazol wurde vom Labor Wilhelm (Speziallabor für organische Analytik, Schrobenhäuser) unter Anwendung der GC/MS-Analyse (chem. Ionisation mit Methanol) an einer alkalisch deaktivierten Trennsäule durchgeführt. Als interne Standards wurden Pyridin und 2-Aminopyridin eingesetzt.



Die Nachweisgrenze liegt bei 0,1 mg/l.

Zusätzlich wurden Schlammproben beider Kläranlagen und der Batch-Versuche am Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene der Universitätsklinik Freiburg auf SMX untersucht.

#### 4.2.3.3 Acetatmessungen

Die Acetatmessung in wässriger Probe erfolgte mit Hilfe der Ionenchromatographie am Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft der TU München. Die Proben wurden vor der Analyse bei 15.000x g 5 min zentrifugiert, um Feststoffe abzutrennen.

#### 4.2.4 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden

Für die Charakterisierung der Belebtschlamm-biozösen der Batch-Versuche wurden verschiedene Techniken eingesetzt. Die Kultivierungstechnik wurde verwendet, um Reinkulturen aus den SMX-angereicherten Batch-Schlämmen zu gewinnen. Nach erfolgreicher Identifizierung wurden diese Reinkulturen für gezielte SMX-Abbauversuche eingesetzt. Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) wurde verwendet, um die für die Abwasserreinigung relevanten Bakteriengruppen in den Batch-Schlämmen nachzuweisen und zu quantifizieren. Zur effizienten Ermittlung der bakteriellen Vielfalt innerhalb dieser Gruppen wurde die Polymerasekettenreaktion mit der Denaturierenden Gelelektrophorese (PCR-DGGE) kombiniert. Die Gewinnung und Identifizierung von Reinkulturen sowie die Sequenzierung und Sequenzanalyse von dominierenden DGGE-Banden in SMX-angereicherten Schlämmen lieferten Informationen über potentielle SMX abbauende Mikroorganismen und ermöglichten den Einsatz von FISH mit spezifischen Sonden für SMX-Abbauer. Das Vorkommen von SMX-Resistenzgenen als ein weiteres Untersuchungsziel in diesem Projekt wurde in verschiedenen Kläranlagen-Kompartimenten bis hin zum Ablauf untersucht, um eine Aussage über den Eintrag in das Gewässer und ein potentielles Umweltrisiko treffen zu können. Hierfür wurde die PCR-Technik mit spezifischen Primern zur Detektion von Sulfonamid-Resistenzgenen eingesetzt.

##### 4.2.4.1 Kultivierungstechnik und Charakterisierung der gewonnenen Isolate

Die Reinkulturen wurden aus SMX abbauenden Belebtschlamm-biozösen der Batch-Versuche gewonnen. Für die Isolierung und Aufreinigung der Mikroorganismen kam ein angepasstes R2A-Medium zum Einsatz, das sich aus verschiedenen C-Quellen und 50 mg/l SMX zusammensetzte (Pei et al., 2006, Reasoner und Geldreich, 1985). Weiter wurden zwei verschiedene Nährmedien in Anlehnung an den Zahn-Wellenstest (DEV, 2000) verwendet: ZWB-Medium mit 50 mg/l SMX als Kohlenstoffquelle sowie 7,5 mg/l Ammoniumnitrat als Stickstoffquelle; ZWC-Medium mit 50 mg/l SMX als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. Zu beiden ZW-Medien wurde zusätzlich 0,1 ml/l einer Spurenelementlösung nach Hoagland zugesetzt. Alle Nährmedien wurden mit 15 g/l Agar verfestigt. Die Inkubation der Isolate erfolgte bei 20°C für 14 bis 28 d in Abhängigkeit ihres Wachstums.

Eine erste Einteilung der gewonnenen Isolate erfolgte über ihre Kolonie- und Zellmorphologie sowie ihr Gram-Färbeverhalten. Die für die Identifizierung verwendeten molekularbiologischen Methoden sind im Folgenden beschrieben.

##### 4.2.4.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Zur Charakterisierung der Belebtschlamm-biozösen wurden Gensonden (mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte rRNA-gerichtete Oligonukleotidsonden, Tab. 9) für die in der Literatur beschriebenen dominanten Bakteriengruppen von Abwasserbiozösen eingesetzt (Björnsson et al., 2002, Loy et al., 2003, Manz et al., 1994, Snaidr et al., 1997). Die Oligonukleotidsonden wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die FISH-Methode (siehe Amann, 1995; Arbeiter, 2008) ermöglicht die mikroskopische Identifizierung der verschiedenen Organismen direkt in der Belebtschlammflocke. Die Quantifizierung der FISH-Signale erfolgt über die Einteilung in

5 Kategorien von 0 = keine bis 5 = sehr viele Signale, mit einem Faktor 10 zwischen den Kategorien (Müller et al., 2007). Nach Identifizierung der Reinkulturen und Auswertung der Sequenzierung der dominierenden DGGE-Banden in den SMX-angereicherten Schlämmen wurden spezifische Gensonden für potentielle SMX-Abbauer ausgewählt und diese mit der FISH-Technik in situ detektiert (Tab. 9).

Tab. 9: Verwendete rRNA-gerichtete Oligonukleotidsonden mit den zu detektierenden Zielorganismen sowie für die Hybridisierung verwendete Formamidkonzentrationen

rRNA gerichtete Oligonukleotidsonde	Zielorganismus/-gruppe	Formamid [%]	Literatur
EUB338 EUB338-II EUB338III = EUB338-Mix	<i>Bacteria</i> <i>Bacteria, Planctomycetales</i> <i>Bacteria, Verrucomicrobia</i>	0-60	(Loy et al., 2003)
Bet42a	<i>Betaproteobacteria</i>	35	(Loy et al., 2003)
Gam42a	<i>Gammaproteobacteria</i>	35	(Loy et al., 2003)
Alf969	<i>Alphaproteobacteria</i>	20	(Loy et al., 2003)
CF931a	<i>Bacteroidetes</i>	35	(Loy et al., 2003)
LGC35a,b,c	<i>Firmicutes</i>	35	(Loy et al., 2003)
HGC1156	<i>Actinobacteria</i>	20	(Erhart, 1997)
GNSB941	<i>Chloroflexi</i>	35	(Björnsson et al., 2002)
ZOGL0828	<i>Zoogloea</i> spp.	35	(Loy et al., 2003)
Parc0651	<i>Paracoccus</i> spp.	40	(Loy et al., 2003)
Pdi659	<i>Brevundimonas</i> spp.	20	(Loy et al., 2003)
G-Gor-0596-a-A22	<i>Gordonia</i> spp.	20	(Loy et al., 2003)
Myc657	<i>Corynebacterineae</i> = Mycolata	30	(Davenport et al., 2000)

#### 4.2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine einfache und schnelle Methode, um geringe Mengen an DNA nach einem Extraktionsschritt zu vervielfältigen (amplifizieren). In diesem Projekt wurde die PCR-Technik kombiniert mit anderen Methoden für verschiedene Fragestellungen eingesetzt. Die Amplifikation der DNA wurde mit dem HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) in Anlehnung an das vom Hersteller empfohlene Protokoll durchgeführt. In der Tab. 10 sind die verwendeten Primer (Synthese Eurofins MWG Operon) mit ihrer zugehörigen Spezifität, der angewandten Methode und den verwendeten PCR-Bedingungen gelistet. In drei Diplomarbeiten sind detaillierte Informationen zu den durchgeführten PCR-Techniken zu finden, für die PCR-DGGE bei Arbeiter (2008), für die PCR-RFLP bei Vierheilig (2009) und für die PCR der Sulfonamid-Resistenzgene bei Reutelshöfer (2009).

Tab. 10: Verwendete Primer zur Amplifikation und Sequenzierung der 16S rDNA und der Sulfonamid-Resistenzgene mit Spezifität, eingesetzter Methode sowie PCR-Bedingungen

Primer	Spezifität	Methode	PCR-Bedingungen	Literatur
GC-341f 907r	16S rDNA <i>Bacteria</i>	PCR-DGGE	Ta=52°C	(Muyzer et al., 1995)
Beta680f GC-1055r	16S rDNA <i>Betaproteo- bacteria</i>	PCR-DGGE	Ta=56°C Ta=51°C	(Gich et al., 2005)
685f GC-1055r	16S rDNA <i>Gammaproteo- obacteria</i> <i>Betaproteobacteria</i>	PCR-DGGE	Ta=62°C	(Ranjard et al., 1998)
GC-517f Alf968r	16S rDNA <i>Alphaproteo- bacteria</i>	PCR-DGGE	Ta=68°C Ta=62°C	(Gich et al., 2005)
1.PCR Act235f AB1165r 2.PCR GC-341f 907r	16S rDNA <i>Actinobacteria</i>	PCR-DGGE	Nested PCR 1.PCR Ta=58°C 2.PCR Ta=52°C	(Müller, 2006)
GNSB941f 1492r	16S rDNA <i>Chloroflexi</i>	PCR-DGGE	Ta=55°C	(Gich et al., 2001)
27f 1492r	16S rDNA <i>Bacteria</i>	PCR-RFLP	Ta=52°C	(Lane, 1991)
341f 1055r 517f GNSB951f	16S rDNA	Sequenzierung von DGGE- Banden	Fa. Eurofins MWG Operon	(Lane, 1991) (Gich et al., 2001)
517r 341f 907f	16S rDNA <i>Bacteria</i>	Sequenzierung von Reinkultu- ren	Fa. Eurofins MWG Operon	(Lane, 1991)
Sul1f Sul1r	Sulfonamid- Resistenzgen Sul1	PCR real-time PCR	Ta=65°C	(Pei et al., 2006)
Sul2f Sul2r	Sulfonamid- Resistenzgen Sul2	PCR real-time PCR	Ta=57,5°C	(Pei et al., 2006)
Sul3f Sul3r	Sulfonamid- Resistenzgen Sul3	PCR real-time PCR	Ta=61°C	(Pei et al., 2006)
341f 543r	16S rDNA <i>Bacteria</i>	real-time PCR	Ta=55°C	(Lane, 1991)

## DNA-Extraktion

Verschiedene DNA-Extraktionsmethoden wurden in Abhängigkeit vom Probenotyp angewandt. Die DNA aus den Batch-Schlämmen (Diversitätsbestimmung mit PCR-DGGE) wurde mit Hilfe des FASTDNA SPIN Kit (MP Biomedical Europe, Illkirch, Frankreich) extrahiert. Die dominanten DGGE-Banden der SMX-angereicherten Schlämme wurden nicht mit einem Kit, sondern nach folgendem Protokoll extrahiert: sie wurden nach Zugabe von 100 µl TE-Puffer (100 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, pH 7) bei 37°C 3 h geschüttelt. Davon wurden 80 µl unter Zugabe von 160 µl kaltem Ethanol und 4 µl Glycogen (20ng/µl) bei -20°C über Nacht inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (14.000x g, 15 min bei 4°C) wurde das Pellet getrocknet und in 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> aufgenommen. Die DNA-Extraktion aus den Reinkulturen (Identifizierung mit PCR-RFLP und Sequenzierung) wurde mit dem Blood/Tissue

Kit nach dem "Protokoll für blood" durchgeführt (Qiagen). Verschiedene Probenvolumina aus den Kläranlagen-Kompartimenten zum Nachweis von Sulfonamid-Resistenzgenen mit PCR (Tab. 11) wurden über einen Polycarbonatfilter (Millipore, Durchmesser 47 mm, Porengröße 0,22 µm) filtriert, um die DNA anzureichern. Anschließend wurde die DNA über eine Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode extrahiert (detaillierte Beschreibung siehe Reutelshöfer, 2009). Alle DNA-Extrakte wurden bei -20°C gelagert.

Tab. 11: Filtrierte Probenvolumina aus den Kläranlagen-Kompartimenten für den Nachweis von Sulfonamid-Resistenzgenen (BB=Belebungsbecken, BS=Belebtschlamm)

Probe	Filtriertes Volumen	Probe	Filtriertes Volumen
KBA-M2 Rohabwasser	10 ml	MBA-MH Rohabwasser	10 ml
KBA-M2 Zulauf BB1	20 ml	MBA-MH Zulauf BB	15 ml
KBA-M2 BS BB1	0,5 und 1 ml	MBA-MH BS	0,5 und 1 ml
KBA-M2 Zulauf BB2	40 ml	MBA-MH BS-Überstand	70 ml
KBA-M2 BS BB2	0,5 und 1 ml	MBA-MH Ablauf	1000 ml
KBA-M2 Ablauf vor UV	100 ml		
KBA-M2 Ablauf nach UV	100 ml		

### PCR-DGGE

Mit dieser Methode wurde aus dem Schlamm gewonnene DNA über die PCR mit Primern spezifisch für die Domäne *Bacteria* und für bestimmte Bakteriengruppen (Tab. 10) vervielfältigt. Aus der Vielzahl an so gewonnenen DNA-Stücken wurden Bakterien-spezifische Sequenzabschnitte über eine spezielle Gel-Elektrophorese, die Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE), in Banden aufgetrennt, deren Muster die Beurteilung der Diversität ermöglichen (PCR-DGGE-Technik siehe Arbeiter, 2008, Muyzer et al., 1995). Dominante Banden aus den SMX-angereicherten Schlämmen wurden ausgeschnitten, die DNA aus den Banden extrahiert, mit Hilfe der PCR vervielfältigt und schließlich sequenziert.

### PCR-RFLP

Mit dieser Technik wurde die 16S rDNA der einzelnen Bakterienisolate mit Hilfe der PCR und spezifischen 16S rDNA Primern (27f und 1492r) vervielfältigt und anschließend mit einem Restriktionsenzym (HaeIII) inkubiert. Das Restriktionsenzym schneidet die DNA an verschiedenen Stellen. Dadurch erhält man für jedes Bakterienisolat mehrere DNA-Fragmente unterschiedlicher Längen (Restriktionsverdau). Durch den Auftrag des Restriktionsprodukts auf ein Agarosegel und die Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese ergeben sich unterschiedliche DNA-Profile (detaillierte Beschreibung der Methode siehe Vierheilig, 2009).

### Sequenzierung und vergleichende Sequenzanalyse

Die vervielfältigte DNA von dominanten DGGE-Banden (spezifische Gruppenprimer) und ausgewählten Reinkulturen (Primer 27f und 1492r) wurde mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Diese gereinigten PCR-Produkte wurden von der Firma Eurofins MWG Operon sequenziert. Dabei wurden spezifische Sequenzierprimer für Bakteriengruppen für die Sequenzierung der DGGE-Banden verwendet (Tab. 10). Für die Teilsequenzen der Reinkulturen wurde der Primer 517r eingesetzt. Zusätzlich wurden noch die Primer 341f und 907 verwendet, um eine Vollsequenz für einige ausgewählte Reinkulturen zu erhalten. Die Sequenzdaten wurden mit

Hilfe von BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), Altschul et al., 1990) und des ARB-Software-Pakets (Ludwig et al., 2004) phylogenetisch analysiert.

### Konventionelle PCR und real-time PCR zum Nachweis von Sulfonamid-Resistenzgenen

Die Verwendung von spezifischen Primerpaaren ermöglicht die Vervielfältigung der Plasmid-codierten Sulfonamid-Resistenzgene Sul1, Sul2 und Sul3. Die Kläranlagen-Kompartimente Rohabwasser, Zulauf Belebung, Belebtschlamm und Ablauf Kläranlage wurden (1) mit der konventionellen PCR (qualitativer Nachweis) und (2) mit der real-time PCR (quantitativer Nachweis) untersucht. Die verwendeten Primer sind in Tab. 10 aufgelistet. Eine detaillierte Beschreibung der Methode mit den spezifischen PCR-Bedingungen sowie der Auswertung findet man in der Diplomarbeit Reutelshöfer (2009).

#### 4.2.5 SMX-Abbauversuche mit Reinkulturen

Ausgewählte Bakterienisolate aus den Belebtschlamm-biozösen der Batch-Versuche zum SMX-Abbau wurden als Konsortium von Reinkulturen in verschiedenen SMX-Abbauversuchen eingesetzt (vgl. Tab. 14). Hierfür wurden in einem Vorversuch Kolonien von einem Festmedium abgeimpft und in einem Flüssigmedium (ZWA Medium = 88 mg/l Na-Acetat-C, 10 mg/l SMX und 2,63 mg/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3\text{-N}$ , 0,1 ml/l Spurenelementlösung nach Hoagland ) für 3 Wochen bei 22°C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Danach wurden 4 Versuchsansätze mit je 3 Parallelen mit dieser Vorkultur angeimpft (A, B, C und D, Details siehe Tab. 12). Zusätzlich wurden (1) Kontrollansätze von jedem Medium ohne Inokulum (KA, KB, KC und KD) und (2) Kontrollansätze ohne SMX-Zugabe (KE, KF, KG und KH) verwendet. Alle Versuchs- und Kontrollansätze wurden 5 Wochen unter aeroben Bedingungen bei 22°C inkubiert. Die beiden Substanzen SMX und Acetat wurden zu Beginn des Versuchs, während der Kultivierung 1-mal pro Woche und am Ende des Versuchs bei allen Ansätzen bzw. bei den Ansätzen A und D gemessen. Zusätzlich wurde die Biomasseentwicklung wöchentlich photometrisch über die optische Dichte bestimmt (OD-Messung bei 600 nm). Die gemessenen OD-Werte wurden über eine Eichkurve in die Einheit FAU600 (Formazine Attenuation Units, 600 nm) umgerechnet. Bei Versuchsabbruch wurde von den 4 Versuchsansätzen die Gesamtzellzahl pro ml nach einer Färbung mit Acridinorange bestimmt (siehe Vierheilig, 2009). Die FISH-Technik mit spezifischen Sonden für die eingesetzten Reinkulturen (Tab. 9) wurde verwendet, um die Zusammensetzung des Bakteriumkonsortiums am Ende des Versuchs zu beschreiben und potentielle SMX-Abbauer zu quantifizieren.

Tab. 12: Bedingungen in den Versuchsansätzen zum SMX-Abbau mit Reinkulturen

Ansätze	Volumen	Vorkultur	Medium
A	100 ml	0,5 ml	88,0 mg/l Na-Acetat-C, 10 mg/l SMX, 2,63 mg/l $\text{NH}_4\text{NO}_3\text{-N}$
B	100 ml	0,5 ml	10 mg/l SMX, 2,63 mg/l $\text{NH}_4\text{NO}_3\text{-N}$
C	100 ml	0,5 ml	10 mg/l SMX
D	100 ml	0,5 ml	88,0 mg/l Na-Acetat-C, 10 mg/l SMX
KA	40 ml	-	88,0 mg/l Na-Acetat-C, 10 mg/l SMX, 2,63 mg/l $\text{NH}_4\text{NO}_3\text{-N}$
KB	40 ml	-	10 mg/l SMX, 2,63 mg/l $\text{NH}_4\text{NO}_3\text{-N}$
KC	..40 ml	-	10 mg/l SMX
KD	..40 ml	-	88,0 mg/l Na-Acetat-C, 10 mg/l SMX
KE	100 ml	0,5 ml	88,0 mg/l Na-Acetat-C, 2,63 mg/l $\text{NH}_4\text{NO}_3\text{-N}$
KF	100 ml	0,5 ml	2,63 mg/l $\text{NH}_4\text{NO}_3\text{-N}$
KG	100 ml	0,5 ml	-
KH	100 ml	0,5 ml	88,0 mg/l Na-Acetat-C

## 4.3 Ergebnisse und Diskussion

### 4.3.1 Sulfamethoxazol-Screening

Das Screening des Antibiotikums SMX und seines Human-Metaboliten Ac-SMX erfolgte in zwei kommunalen Kläranlagen mit unterschiedlicher Verfahrenstechnik: (1) eine zweistufige konventionelle Belebungsanlage (KBA-M2) und (2) eine einstufige Membranbelebungsanlage (MBA-MH) (siehe Kapitel 4.2.1). Der Schwerpunkt dieses Screenings war es, die Eliminationsleistung für SMX und Ac-SMX der verschiedenen Reinigungsstufen zu bestimmen. Hierfür wurden verschiedene Kläranlagen-Kompartimente wie Rohabwasser, Zuläufe der Belebungsbecken und Kläranlagenabläufe (KBA-M2 vor und nach der UV-Desinfektion) bzw. in der MBA-MH zusätzlich die wässrige Phase des Belebtschlammes (= BS-Überstand) als 24 h-Mischproben auf SMX und Ac-SMX untersucht (Abb. 33). Zusätzlich wurde auch die Sorptionskapazität der Schlämme bestimmt.

In der zweistufigen Anlage KBA-M2 lagen die SMX-Konzentrationen (Abb. 33A) über den Untersuchungszeitraum im Rohabwasser zwischen 200 und 2000 ng/l mit dem höchsten Wert im September 08. Im Gegensatz dazu wurden die höchsten Ac-SMX-Konzentrationen von 2000 ng/l im Februar 08 bestimmt. In den Wintermonaten ist das Verhältnis SMX zu Ac-SMX zugunsten des Humanmetaboliten verschoben, in den Sommermonaten liegen SMX und Humanmetabolit zu etwa gleichen Teilen vor. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass im Sommer das Ac-SMX durch einen Deacetylierungsschritt bereits in der Kanalisation teilweise zu SMX rücktransformiert wird. Im Winter – wohl aufgrund der niedrigeren Temperaturen – erfolgt die Rücktransformation weniger effektiv.

In der Membrananlage MBA-MH (Abb. 33 B) wurden im Februar 07 sehr geringe SMX- und Ac-SMX-Konzentrationen von 140 bzw. 250 ng/l im Rohabwasser gemessen. Höhere Werte im Rohabwasser wurden im März 08 (390 und 830 ng/l) und deutlich höhere Konzentrationen von 1500 ng/l SMX und 1100 ng/l Ac-SMX im Juli 08 bestimmt. Diese Ergebnisse zeigen, dass insbesondere in relativ kleinen Anlagen die Konzentrationen von SMX und Ac-SMX in Abhängigkeit vom Einzugsgebiet, aber auch vom Probennahmezeitpunkt, jedoch unabhängig von der Jahreszeit (vgl. Feb. 07 und Feb. 08) stark schwanken können.

Sowohl SMX als auch Ac-SMX, das in der Kanalisation oder in der Kläranlage durch einen Deacetylierungsschritt in die Ursprungssubstanz rücktransformiert wird, wurden in beiden Anlagen deutlich reduziert, wobei die MBA-MH mit 40-100% Eliminationsleistung deutlich über der KBA-M2 mit 30-80% Elimination lag. Dies wird durch Untersuchungen von Göbel et al. (2007) bestätigt, die eine 80%ige SMX-Elimination im Membranverfahren und ca. 60% Reduktion im konventionellen Belebungsverfahren fanden.

In der KBA-M2 fand im Februar 07 und Februar 08 die Hauptelimination des SMX in der Hochlaststufe statt (23-50%), allerdings konnte im Februar 08 eine weitere Reduzierung vom Zulauf des Belebungsbeckens 2 zum Ablauf von 26% beobachtet werden. Dies weist auf einen weiteren möglichen SMX-Abbau in der Nitrifikationsstufe bzw. im nachgeschalteten Sandfilter hin. Im Gegensatz dazu fand im August 08 die höchste SMX-Reduzierung mit 57% im Sandfang und/oder der Vorklärung statt, in der Hochlast- und Niedriglaststufe wurden nur 8% bzw. 2% eliminiert. Möglicherweise ist die starke Eliminierung schon vor der Belebungsstufe auf höhere Abwassertemperaturen und damit höhere Aktivitäten der Mikroorganismen schon in den Vorreinigungsstufen zurückzuführen. Betrachtet man die SMX- und Ac-SMX-Werte im Ablauf vor und nach der UV-Desinfektion, verringerten sich die Konzentrationen um weitere 13%. Im September 08 wurde eine ca. 20%ige Eliminationsleistung von SMX und Ac-SMX sowohl in der mechanischen Reinigungsstufe als auch in beiden biologischen Stufen festgestellt. Vergleicht man diese Ergebnisse mit Literaturdaten, so wird nur die hohe SMX-Elimination in der Hochlaststufe KBA-M2 von Perez et al. (2005) bestätigt, die einen guten Primärabbau verschiedener

Sulfonamide nur in der Hochlaststufe fanden, jedoch nicht in der Nitrifikationsstufe.

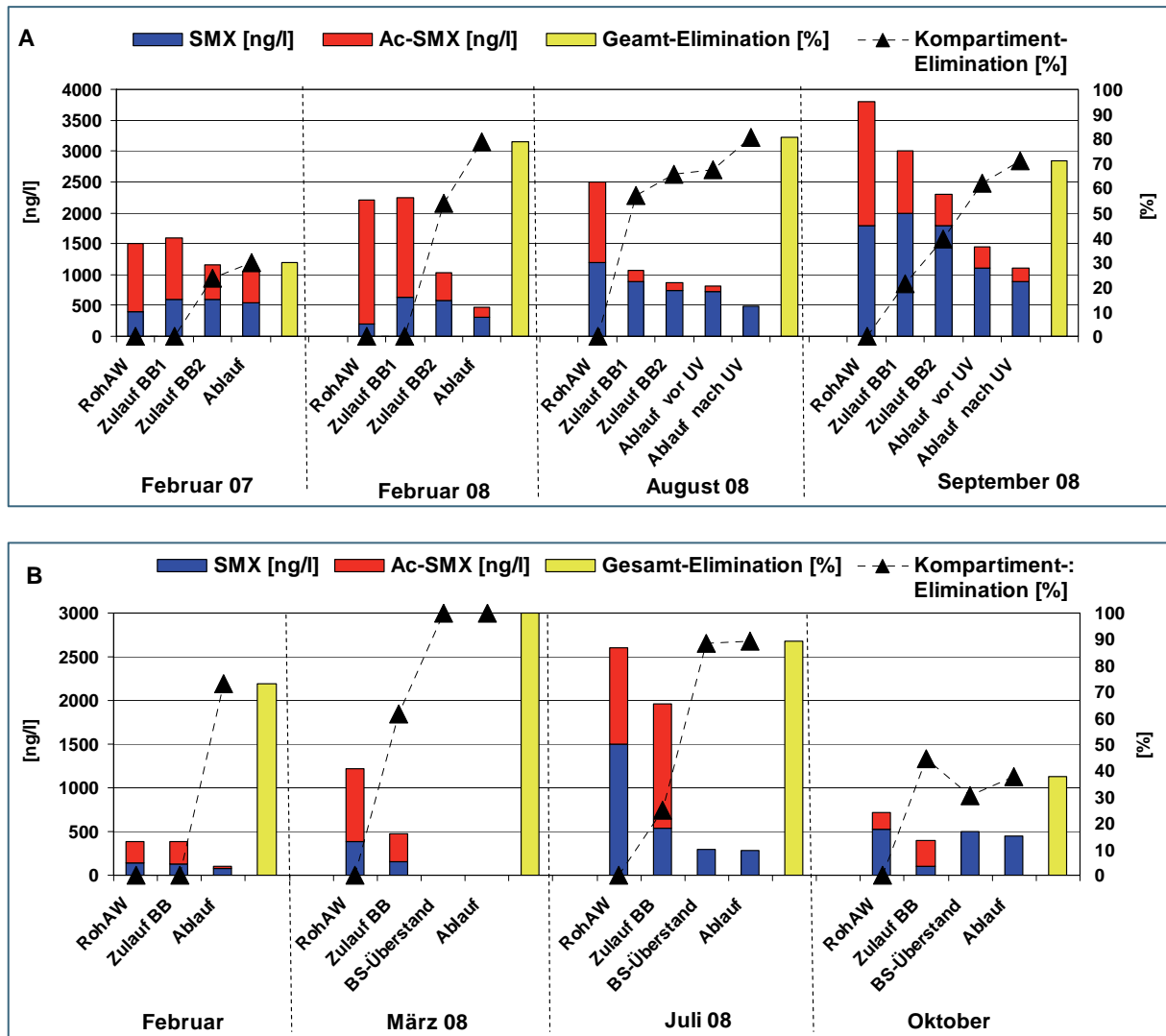


Abb. 33: Antibiotikum SMX und sein Human-Metabolit Ac-SMX in der zweistufigen Belebungsanlage KBA-M2 (A) sowie der Membrananlage MBA-MH (B): im Rohabwasser RohAW), in der wässrigen Phase des Belebtschlammes (MBA-MH, BS-Überstand), im Zulauf Belebungsanlage und im Kläranlagenablauf (für KBA-M2 im Sommer vor und nach der UV-Desinfektion) (BB1 = Belebungsbecken 1, Hochlaststufe, BB2 = Belebungsbecken 2, Niedriglaststufe)

Auch in der MBA-MH erfolgte im März, Juli und Oktober 08 bereits in der Vorklärung eine Reduzierung von SMX und Acetyl-SMX von 25 bis 60%. Im März und Juli 08 wurde eine zusätzliche Eliminierung des SMX von 38 bis 60% in der Belebungsanlage festgestellt, wobei eine höhere Eliminationsrate in der Vorklärung eine niedrigere in der Belebungsanlage folgte. Im Oktober wurde hingegen keine Eliminierung in der biologischen Reinigungsstufe beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde im Februar 07 die Gesamteliminierung von 73% nur in der biologischen Stufe erreicht. Möglicherweise war die Vorklärung im Winter wegen niedriger Temperatur weniger wirksam. Der Vergleich der gemessenen SMX- und Ac-SMX-Konzentrationen in der wässrigen Phase des Belebtschlammes (= BS-Überstand) und im Ablauf zeigte deutlich, dass die Membranfiltration keine weitere Reduzierung bewirkt. Die höhere Eliminationsleistung der Membrankläranlage im Vergleich zur konventionellen Belebungsanlage ist wohl auf das höhere Schlammalter in der Membrankläranlage zurückzuführen. Das Schlammalter kann in diesem

Verfahren deutlich erhöht werden, da die Trennung des Abwassers vom Belebtschlamm nicht durch Sedimentation im Nachklärbecken, sondern direkt im Belebungsbecken durch Filtration stattfindet. Eine Steigerung der Biomasse um das Zehnfache im Vergleich zur konventionellen Belebungsanlage bleibt ohne Auswirkung auf die Ablaufqualität. Durch eine längere Verweilzeit des Schlammes im Belebungsbecken erfolgt eine optimale Adaption der Biozönose an die Abwasserinhaltsstoffe. Das macht auch den Abbau schwerer abbaubarer Verbindungen wahrscheinlicher.

Die Adsorption von SMX an den Schlämmen wurde für beide Anlagen mit 1-4 µg SMX /kgTS (50% Wiederfindungsrate) bestimmt. Damit liegt die Sorption mit etwa 1% ähnlich niedrig wie in Literaturangaben, z.B. 0,3 % bei Untersuchungen von Carballa et al. (2005). Sorptionsprozesse spielen folglich nur eine sehr geringe Rolle und es kann davon ausgegangen werden, dass die SMX-Reduzierung in der Belebungsstufe hauptsächlich über einen biologischen Abbau erfolgt. Trotz der sehr guten Eliminationsleistungen beider Kläranlagen wurden in den Kläranlagenabläufen SMX-Konzentrationen bis zu 900 ng/l und Ac-SMX-Konzentrationen bis zu 500 ng/l gemessen. Der Eintrag von SMX in die aquatische Umwelt stellt trotz der niedrigen Konzentrationen in vieler Hinsicht ein potentielles Umweltisiko dar. Als mögliche Risiken sind zu diskutieren a) die Entwicklung von resistenten Keimen und b) die Beeinflussung inter-organismerischer Kommunikation durch die Induktor-Funktion mancher Antibiotika, wie jüngste Forschungen zeigten (Fajardo und Martínez, 2008).

#### 4.3.2 SMX-Abbaupotential von Abwasserbiozönosen (Batch-Versuche)

Für den Nachweis eines Abbaus von SMX wurden Batch-Versuche mit Hochlastbelebtschlamm einer zweistufigen Anlage im semikontinuierlichen „fill and draw“ Modus eingesetzt (vgl. Kap. 4.2.2). SMX wurde als Cosubstrat (Ansätze 2 und 3 in der Adaptionphase; Ansatz 2 in der Versuchsphase) bzw. als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle (Ansatz 3 in der Versuchsphase) zudosiert. Nach 2 Wochen Adaption wurde die Anfangskonzentration von 10 mg/l SMX (= 4,7 mg/l SMX-C) in den Ansätzen 2 und 3 in der Wasserphase nicht mehr nachgewiesen (Nachweisgrenze 250 µg/l, Abb.33). Im weiteren Verlauf der Phase 1 konnte SMX drei bis vier Tage nach der fortgesetzten Zudosierung von 1,3 bis zu 12 mg/l SMX (= 0,6 bis 5,6 mg/l SMX-C) nicht mehr detektiert werden. Die Ergebnisse der Schlammanalytik zeigten, dass SMX nur in sehr geringen Konzentrationen an den Schlamm adsorbiert ist (Ansatz 2 = 100 µg SMX /kg TS und Ansatz 3 = 400 µg SMX /kg TS) und folglich ein biologischer Abbau stattgefunden haben sollte. Die DOC-Elimination (Abb. 34) lag in der Adaptionphase in der Kontrolle zwischen 70 und 90%. In den Versuchsansätzen lag sie deutlich darunter, im Ansatz 2 um ca. 10%, im Ansatz 3 bis zu 20% niedriger.

In der Versuchsphase 2 wurde SMX in dem Ansatz 2 weiterhin als Cosubstrat in höheren Konzentrationen von 10 mg/l (= 4,7 mg/l SMX-C) bzw. im Ansatz 3 als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle in Konzentrationen von 19 bis 50 mg/l (8,9 mg/l SMX-C bis 23,5 mg/l SMX-C) zudosiert. Im Ansatz 2 wurden über den gesamten Versuchszeitraum die SMX-Konzentrationen von 10 mg/l innerhalb von drei Tagen eliminiert und im System entwickelte sich eine stabile DOC-Elimination von 70%.

Im Gegensatz dazu beobachtet man im Ansatz 3 nur die ersten 20 d eine optimale SMX-Elimination bei zudosierten Konzentrationen von 19 mg/l SMX. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Schlammbiozönose SMX als C- und N-Quelle für ihr Wachstum nutzen kann. Die erhöhten SMX-Konzentrationen von 50 mg/l werden von der Biozönose nicht mehr vollständig abgebaut und es kommt zu einer SMX-Anreicherung im System. Die kontinuierliche Abnahme der DOC-Elimination von 36,5% nach 3d auf 10% nach 13 d Inkubation mit SMX als einzige C- und N-Quelle zeigen, dass die Biozönose im Ansatz 3 aufgrund des zudosierten Acetats in der Adaptionphase zu Beginn der Versuchsphase noch eine höhere Aktivität aufweist. Im weiteren Versuchsverlauf adaptierten sich die Mikroorganismen an SMX als einzige C- und N-Quelle, was mit dem Anstieg der DOC-Elimination von 10% am Tag 13 auf 33% ab dem Tag 20 einhergeht.



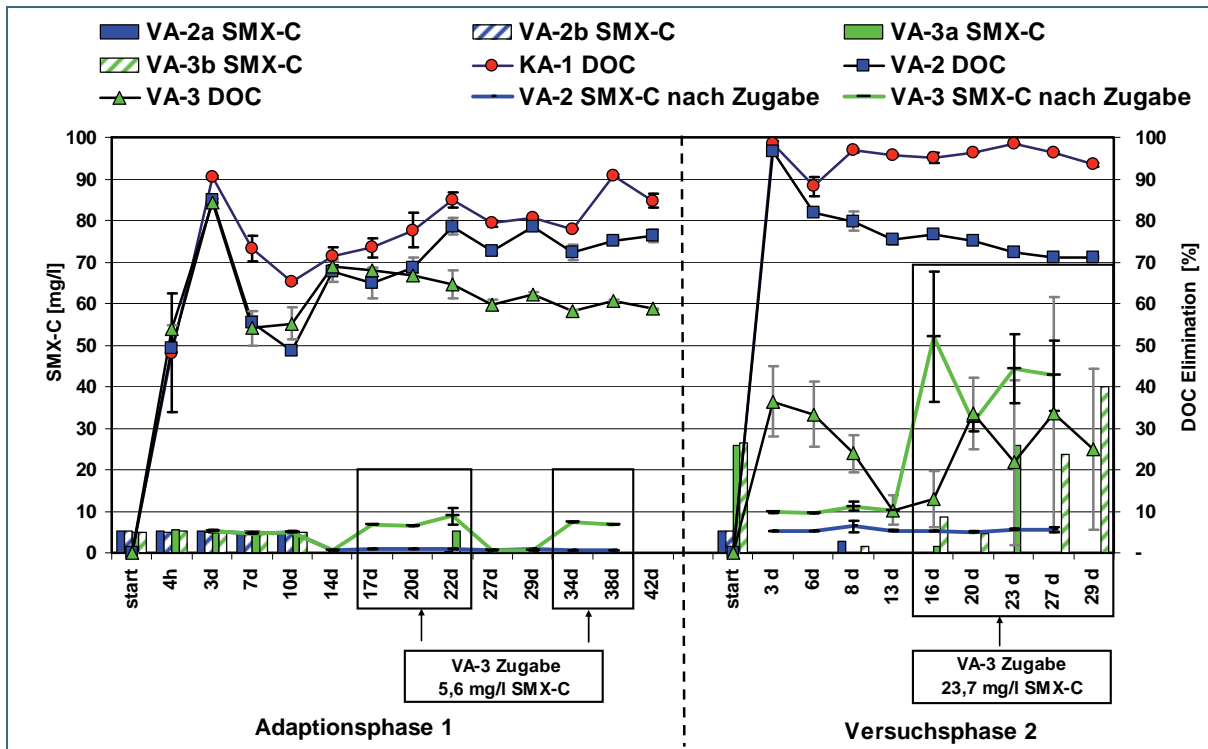


Abb. 34: SMX-Konzentrationen (Einzelwerte der Parallelansätze a und b) und DOC-Elimination (Mittelwerte aus 2 Parallelansätzen und Standardabweichung) der Batch-Ansätze (KA-1 = Kontrollansatz, VA-2 und VA-3 Versuchsansätze mit SMX) der Adaption- und Versuchsphase

Die niedrigeren DOC-Eliminationsraten der Versuchsansätze mit SMX im Vergleich zum Kontrollansatz (70-90% Adaptionphase und 95-100% Versuchsphase) zeigen deutlich, dass SMX nicht vollständig mineralisiert wird und sich ein stabiler Metabolit anreichert. In der Literatur wird 3-Amino-5-methyl-isoxazol als stabiles Abbauprodukt für SMX beschrieben (Hartig, 2000). Das Vorkommen einer Amino-Gruppe und eines Ring-gebundenen Stickstoffs im Isoxazol würde auch die Zunahme des Gesamtstickstoffs erklären, die nur in den Ansätzen 2 und 3 festgestellt wurde. In weiteren Untersuchungen wurde 3-Amino-5-methyl-isoxazol der Versuchsansätze 2 und 3 der Adaptionphase quantifiziert (Abb. 35). Bereits 14 d nach Inkubationsbeginn bei gleichzeitiger SMX-Elimination wurde 3-Amino-5-methyl-isoxazol-C in beiden Versuchsansätzen im Bereich von 1 mg/l nachgewiesen. Während des weiteren Versuchsverlaufs kommt es zu einer Akkumulation dieses Metaboliten mit einer maximalen Konzentration von 3,7 mg/l am Tag 20 im Ansatz 2 und 10 mg/l am Tag 27 im Ansatz 3. Ab dem Tag 20 bzw. 27 nimmt die Konzentration an 3-Amino-5-methyl-isoxazol-C in beiden Ansätzen kontinuierlich ab.

Diese Beobachtung könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei der Substanz 3-Amino-5-methyl-isoxazol nicht um einen stabilen Metaboliten handelt, sondern dass dieser weiter abgebaut wird. Diese Annahme würde durch den Vergleich zwischen gemessenen und theoretisch zu erwartenden Konzentrationen unterstützt, da die gemessenen Konzentrationen für 3-Amino-5-methyl-isoxazol deutlich unter den theoretisch berechneten Konzentrationen liegen (unter der Annahme einer quantitativen Umsetzung).

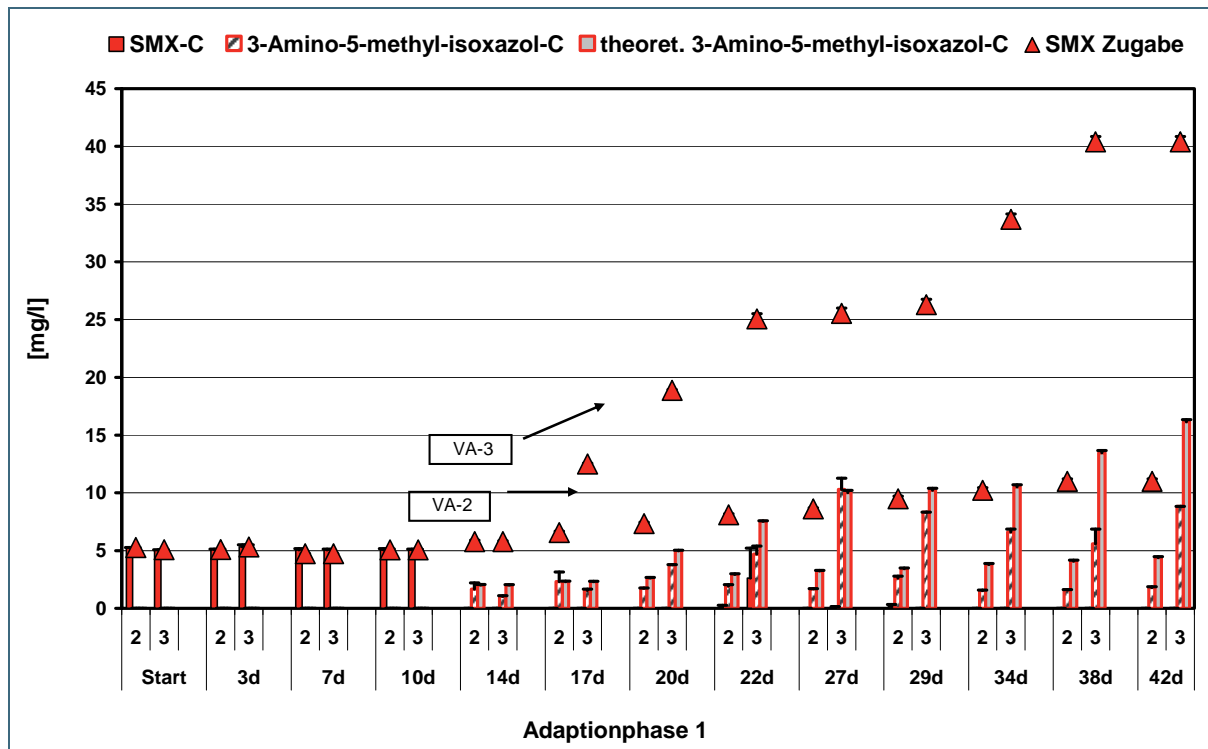


Abb. 35: SMX-Konzentrationen, 3-Amino-5-methyl-isoxazol (gemessene und theoretisch berechnete Konzentration aus der SMX-Zugabe), und die SMX-Zudosierung der beiden Versuchsansätze VA2 und VA3 während der Adaptionphase; dargestellt als Mittelwerte aus 2 Parallelansätzen mit Standardabweichungen

Zur Ermittlung von potentiellen SMX-Abbauwegen wurde eine Datenbank der Universität von Minnesota (biocatalysis/biodegradation database, <http://umbbd.msi.umn.edu>) zu Rate gezogen, die durch Literaturvergleiche metabolische Regeln und damit die Wahrscheinlichkeiten für potentielle Stoffwechselwege in Mikroorganismen ermittelt. Diese Datenbank gibt die Spaltung von SMX in 3-Amino-5-methyl-isoxazol und 4-Aminobenzolsulfonat als ersten Abbauschritt an, der wahrscheinlich nur von Abbau-Spezialisten durchgeführt werden kann. Die Fähigkeit, den Metabolit 4-Aminobenzolsulfonat zu mineralisieren, besitzen dagegen viele Mikroorganismen. Auch die Abspaltung der Methylgruppe vom 3-Amino-5-methyl-isoxazol wird als wahrscheinlich betrachtet. Als stabiler Metabolit wäre dann das 3-Amino-isoxazol zu diskutieren. Für die Umwandlung dieser Substanz in Isoxazol, welche durch Abspaltung der Amino-Gruppe erfolgen würde, wird in der Datenbank keine metabolische Regel angegeben.

Zur Klärung des Konzentrationsabfalls von 3-Amino-5-methyl-isoxazol zu Versuchsende wurden auch noch die Metaboliten 3-Amino-isoxazol sowie Isoxazol in den Ansätzen gemessen. Beide Metaboliten waren nicht aufzufinden (Nachweisgrenze 0,1 mg/l). Dies könnte zum einen bedeuten, dass ein vollständiger Abbau erfolgt, was aufgrund der fehlenden metabolischen Regeln unwahrscheinlich ist. Zum anderen könnte 3-Amino-5-methyl-isoxazol tatsächlich ein stabiler Metabolit sein, dessen Konzentrationsabnahme zu Versuchsende durch die stete Elimination aufgrund von Probenahmen zu erklären ist.

#### 4.3.3 Charakterisierung von SMX abbauenden Mikroorganismen (Belebtschlammsschlämme aus den Batch-Versuchen)

Insbesondere Antibiotika lassen von ihrem Wirkprinzip einen Einfluss auf Zusammensetzung und Diversität mikrobieller Biozöten erwarten, wie etwa eine Populationsverschiebung oder die Reduzierung der Diversität, was für die SMX-angereicherten Schlammökosystemen untersucht wurde.

Zur Bestimmung der mikrobiellen Diversität eignen sich Methoden wie FISH und die PCR-DGGE (vgl. 4.2.4). Diese molekularbiologischen Techniken können aber keine Aussage über in situ-Abbauraten treffen, weswegen zusätzlich die Kultivierungstechnik zur Gewinnung von SMX abbauenden Mikroorganismen eingesetzt wurde. Diese Isolate konnten dann gezielt in Wachstumsversuchen mit SMX eingesetzt werden.

Die Präsenz dieser isolierten SMX-Abbauer in der Schlammbiozönose wurde wiederum mit FISH unter Verwendung von spezifischen Sonden für SMX-Abbauer verifiziert.

#### 4.3.3.1 Identifizierung von Reinkulturen aus SMX abbauenden Biozösen der Batch-Versuche

Die hier beschriebenen Reinkulturen wurden aus SMX abbauenden Belebtschlamm-Biozösen der Batch-Versuche (Kapitel 4.3.2) isoliert. Für die Isolierung und Aufreinigung der Mikroorganismen wurden drei verschiedene Nährmedien verwendet. Auf dem R2A-Medium, welches sich aus verschiedenen Kohlenstoffquellen und 50 mg/l SMX zusammensetzt, sollten gezielt Mikroorganismen isoliert werden, die SMX tolerieren, aber zum Wachstum andere Nährstoffe zur Verfügung haben. Im Gegensatz dazu wurden auf den ZW-Medien gezielt Mikroorganismen kultiviert, die (1) SMX als Kohlenstoffquelle nutzen können (ZWB-Medium) und die (2) SMX als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle verwenden können (ZWC-Medium).

Insgesamt wurden 16 Isolate von R2A+SMX (RSMX-Isolate), 47 Isolate von ZWB und 45 Isolate von ZWC (ZW-Isolate) gewonnen. Die auf dem R2A-Medium gewachsenen Reinkulturen waren durch eine hohe Vielfalt an Kolonietypen charakterisiert und es konnte keine Gruppierung nach Koloniemorphotypen vorgenommen werden. Im Gegensatz dazu wurden die ZW-Isolate unabhängig vom Isolierungsmedium ZWB und ZWC in 5 Kolonietypen eingeteilt (Tab. 13, Abb.36). Der Kolonietyp 5 besitzt eine stark ausgeprägte fädige Struktur. Innerhalb dieses Typs treten ca. 14 verschiedene Morphotypen auf, die alle das charakteristische fädige Wachstum aufweisen, aber deutliche Unterschiede in der Fadendicke, Fadenstruktur und der Ausbildung eines Zentrums zeigen.

Tab. 13: Koloniemorphologie der ZW-Isolate, kultiviert auf ZWB- und ZWC-Festmedium

Medium	Kolonie 1 (K1)	Kolonie 2 (K2)	Kolonie 3 (K3)	Kolonie 4 mit Schwärmsaum (SS)	Kolonie 5 (Stern)
Größe [cm]	0,1-0,2	0,1-0,2	< 0,1		
Farbe	weiß	weiß	durchsichtig	durchsichtig	weiß
Rand	glatt	zerklüftet	glatt	wellig	fädig
ZWB	7	6	3	8	23
ZWC	9	6	9	3	18
Summe	16	12	12	11	41

Untersuchungen zur Zellmorphologie (Abb. 37, Phasenkontrast- und Hellfeld-Bilder) ergaben, dass es sich bei den Isolaten des Kolonietyps 5 (Sternstruktur) eindeutig um Pilze handelt. Dies wurde durch FISH mit einer spezifischen Sonde für *Eukarya* bestätigt (Abb. 37, Epifluoreszenz-Aufnahmen).

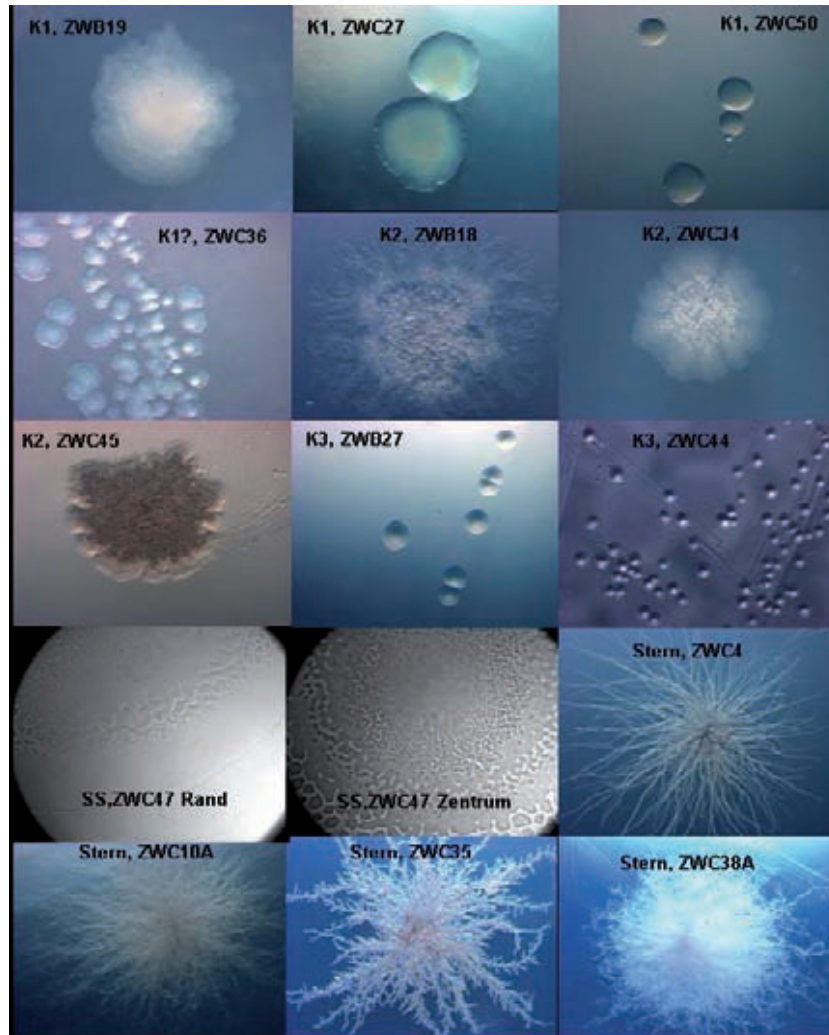


Abb.36: Darstellung repräsentativer Kolonietypen der ZW-Isolate (10-fache Vergrößerung: ZWB19, ZWB27, ZWC4, ZWC10A, ZWC35, ZWC38A; 20-fache Vergrößerung: ZWC50, ZWC36, ZWC34, ZWC45; 30-fache Vergrößerung: KWC27, ZWB18, ZWC44 und 40-fache Vergrößerung: ZWC47

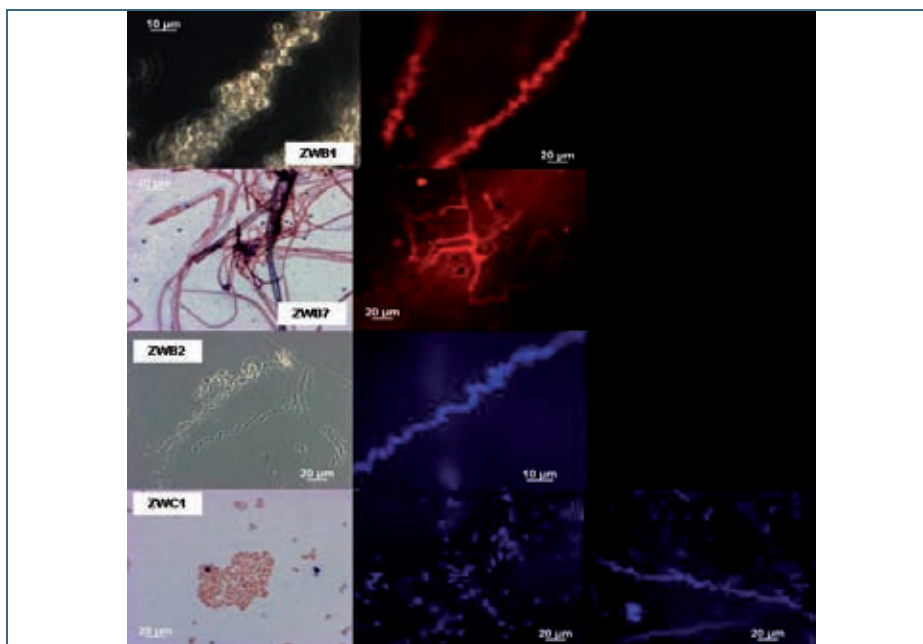


Abb. 37: Mikroskopische Aufnahmen der ZW-Isolate des Kolonietyps 5 (Stern): Phasenkontrast-, Hellfeld-Bilder (Färbung mit Safranin) und Epifluoreszenz-Aufnahmen nach FISH mit der spezifischen Sonde für Eukarya (rote Fluoreszenz) und nach DNA-Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blaue Fluoreszenz)

Tab. 14: Charakterisierung und Identifizierung der Bakterienisolate anhand von Kolonie- und Zellmorphologie, Gram-Färbung, RFLP-Gruppen und phylogenetische Zuordnung der 16S rDNA Vollsequenzen (> 1400 bp) mit Hilfe der BLAST-Analyse (Basic Local Alignment Search Tool, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), Altschul et al., 1990); mit Stern markierten Isolate wurden für die spezifischen SMX-Abbautests eingesetzt (Kapitel 4.3.1)

Isolat/ Anzahl	Kolonie	Zell- morphologie	Gram- färbung	RFLP	nächster Verwandter (Accession-Nr.)	max. Identität [%]
ZWB19* ZWC2 (8)	K1	kurze Stäbchen	negativ	ZW2	<i>Paracoccus</i> sp. (EF575566)	97
ZWB33* (1)	K1	kurze Stäbchen	negativ	ZW2	<i>Paracoccus yeeii</i> (DQ857285)	97
ZWB27A (1)	K1	kurze Stäbchen	negativ	ZW2	<i>Paracoccus</i> sp. (FJ386516)	99
ZWB3* ZWC18 (5)	K1	kurze Stäbchen	negativ	ZW1	<i>Zoogloea oryzae</i> (AB201044)	99
ZWC50* (1)	K1	Stäbchen	positiv	ZW3	<i>Mycobacterium</i> sp. (AY147261)	98
ZWB18* ZWC45 (12)	K2	Stäbchen	positiv	ZW4	<i>Gordonia</i> sp. (AJ002097)	98
ZWB36B ZWC12* (4)	K3	Stäbchen	negativ	ZW8	<i>Brevundimonas</i> sp. (AJ227797)	99
ZWC44 ZWB5 (4)	K3	Stäbchen	negativ	ZW12a ZW2c	<i>Rhizobium</i> sp. (AM084043)	99
ZWB23B* RSMX14 (3)	SS	Stäbchen	negativ	ZW13 RSMX7	<i>Vibrio</i> sp. (DQ146981)	100
ZWB27B* ZWC5b RSMX1a (6)	SS	Stäbchen	positiv?	ZW5 RSMX1	<i>Pseudomonas nitrore- ducens</i> (AF494091)	99
ZWB41B* (2)	SS	Stäbchen	positiv?	ZW14	unkultivierter <i>Pseu- domonas</i> sp. (EF205269)	99
ZWC24 (1)	SS	Stäbchen	positiv?	ZW8	<i>Pseudomonas men- docina</i> (EU395787)	99
ZWC16* ZWB22 RSMX9 (5)	SS neon-gelb	Stäbchen	positiv	ZW8 RSMX1	<i>Pseudomonas</i> sp (GQ284471)	99
RSMX15 (3)	gelb-orange	Stäbchen	positiv	RSMX13	<i>Microbacterium</i> sp. EF540477	99
RSMX3 (1)	weiß	Stäbchen	positiv	RSMX6	<i>Bacillus</i> sp. FJ660933 Teilsequenz	100
RSMX11 (1)	durchsichtig	Kokken	negativ	RSMX11	unkultiviertes Bakte- rium (GQ340110) Teilsequenz	95
RSMX13A (1)	gelb	Stäbchen	negativ	RSMX5	unkultiviertes Bakterium (EU805183) Teilsequenz	100

Die ZW-Isolate der Kolonietypen K1, K2, K3 und K4 (SS) sowie die RSMX-Isolate sind Bakterien, welche anhand ihres Verhaltens in der Gram-Färbung weiter charakterisiert wurden. Um die hohe Anzahl der Bakterienisolate weiter zu gruppieren, wurde die DNA-Fingerprint-Methode des Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) angewendet. Durch den Restriktionsverdau mit einem spezifischen Enzym entstehen pro Bakterienisolat mehrere DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die in einer Agarose-Gelelektrophorese einem spezifischen DNA-Profil zugeordnet werden können. Die Isolate konnten bestimmten Profilgruppen zugeordnet werden. Für die RSMX-Isolate wurden 7 RFLP-Gruppen (RSMX1-7) und für die ZW-Isolate insgesamt 14 RFLP-Gruppen bestimmt (ZW1-ZW14).

Aus jeder RFLP-Gruppe wurde für mindestens 2 Isolate eine Teilsequenz gewonnen (16S rDNA). Durch die Sequenzanalyse mit BLAST (BLAST = Basic Local Alignment Search Tool, Altschul et al., 1990) erfolgte eine erste phylogenetische Identifizierung. Anschließend wurden Vollsequenzen aus 3 Teilsequenzen zusammengestellt und nochmals eine Sequenzanalyse durchgeführt. Die Tab. 14 fasst die Ergebnisse der Charakterisierung und Identifizierung der Bakterienisolate zusammen. Es zeigte sich, dass die Einteilung der Isolate nach ihrer Koloniemorphologie und dem Gram-Färbeverhalten zum größten Teil durch die RFLP-Profile und die Sequenzanalyse bestätigt wurde.

Insgesamt wurden 10 Gattungen aus 5 verschiedenen Bakteriengruppen identifiziert: verschiedene *Paracoccus* spp., *Brevundimonas* sp. und *Rhizobium* sp. (*Alphaproteobacteria*), *Zoogloea oryzae* (*Betaproteobacteria*), verschiedene *Pseudomonas* spp. und *Vibrio* sp. (*Gammaproteobacteria*), *Mycobacterium* sp., *Gordonia* sp. und *Microbacterium* sp. (*Actinobacteria*) sowie *Bacillus* sp. (*Firmicutes*). Die beschriebenen Bakterienarten vor allem der ZW-Isolate können als potentielle SMX-Abbauer diskutiert werden. *Actinobacteria*, im Speziellen die Gruppe der Mycolata, zu denen die beiden Gattungen *Gordonia* und *Mycobacterium* gehören, können verschiedenste Kohlenstoffquellen nutzen und werden in der Literatur als Abbauer verschiedenster Xenobiotika beschrieben (Lemmer und Kroppenstedt, 1984, Soddell et al., 1998). Auch für die Gattung *Pseudomonas* und Verwandte ist bekannt, dass sie eine Vielzahl von verschiedenen Kohlenstoffverbindungen als Energiequelle nutzen können.

#### 4.3.3.2 Zusammensetzung und Diversität der Batch-Schlämme

Um einen Überblick über die Populationsverschiebungen innerhalb der Schlamm-biozöosen durch die Kultivierungsbedingungen und die Zugabe von SMX zu erhalten, wurde die FISH-Technik mit Sonden für die in Abwasserbiozöosen relevanten Bakteriengruppen angewandt. Zur Ermittlung der bakteriellen Vielfalt innerhalb der Gruppen ist hingegen die PCR-DGGE-Technik vorzuziehen, da hierfür bei der FISH-Technik eine sehr hohe Anzahl an Sonden verwendet werden müsste, um diese Bakteriengruppen auf Gattungs- und Artebene beschreiben zu können. Des Weiteren wurden die Sequenzdaten der dominanten DGGE-Banden mit den Vollsequenzen der Reinkulturen verglichen, um Informationen darüber zu erhalten, ob die kultivierten Mikroorganismen in den SMX-angereicherten Schlamm-biozöosen tatsächlich relevant sind. Das Vorkommen dieser Organismen kann dabei nur durch die Anwendung von FISH mit spezifischen Sonden für die relevanten Reinkulturen bestätigt und quantifiziert werden.

Dabei war das Ziel, "Indikatororganismen" für den SMX-Abbau zu finden. Der Nachweis einer Elimination bestimmter Bakterienarten durch den direkten "antibiotischen" Einfluss von SMX kann dabei nicht geführt werden, da SMX als Breitbandantibiotikum auf eine Vielzahl unterschiedlicher Bakterien bakteriostatisch wirkt, d.h. sie in ihrem Wachstum hemmt. Darüber hinaus sind artübergreifend Resistenzgene weit verbreitet. Die beschriebenen Populationsverschiebungen beziehen sich also nur auf den Einfluss von Versuchsbedingungen und die potentielle Nutzung von SMX als Kohlenstoff – und/oder Stickstoffquelle.

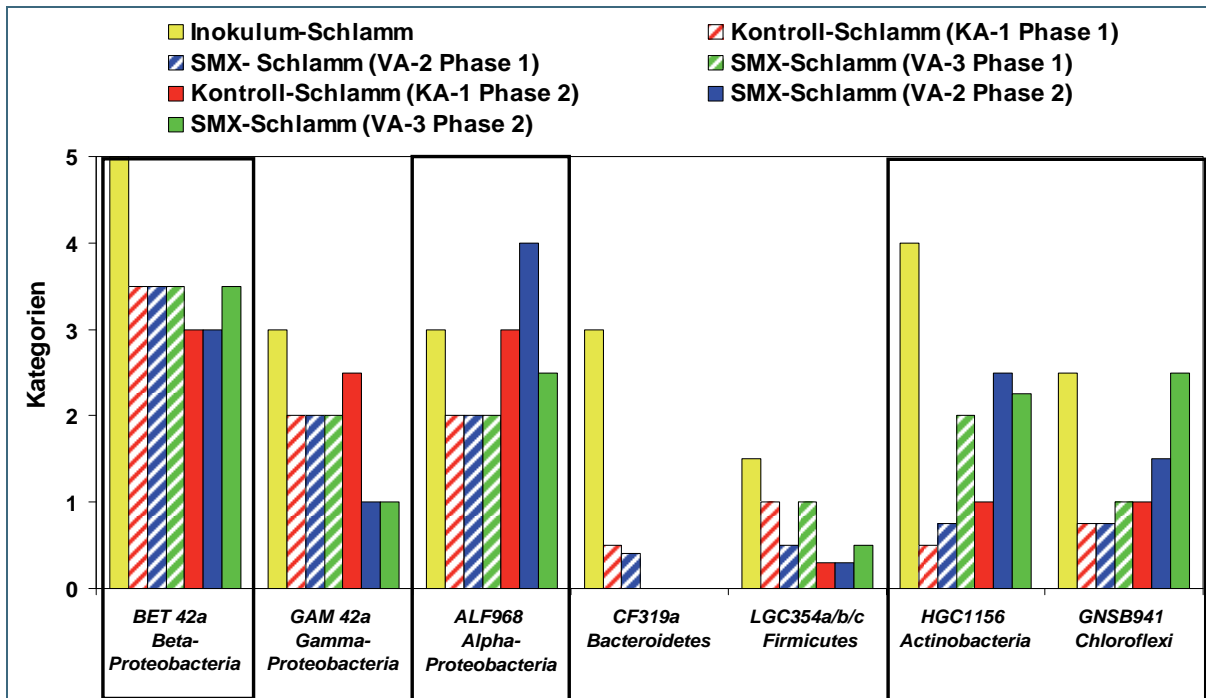


Abb. 38: In situ Nachweis verschiedener Bakteriengruppen in den Biozönosen des Inokulums (Belebtschlamm, KBA-M2, BB1) sowie der Ansätze des Batch-Versuches (KA-1 = Kontrollansatz, VA-2 und VA-3 Versuchsansätze mit SMX) am Ende der Adaptationsphase (Phase 1) und der Versuchsphase (Phase 2) mit FISH

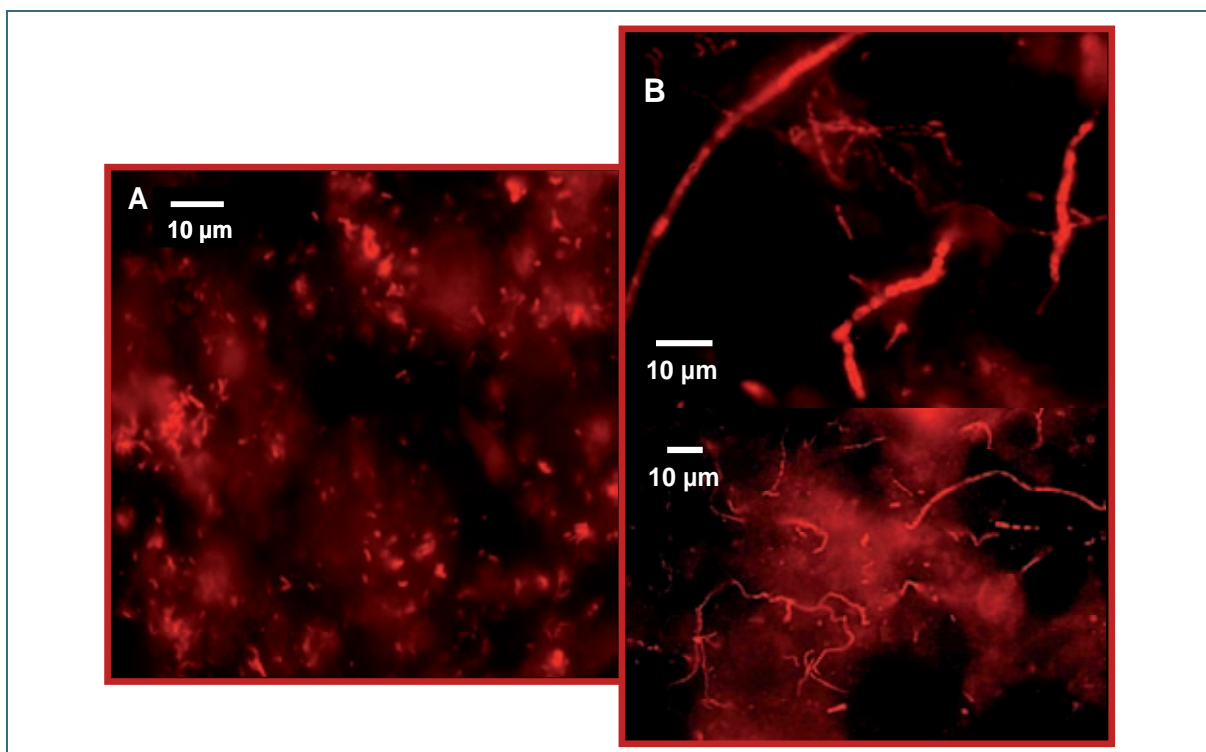


Abb. 39: Epifluoreszenz-Aufnahmen: SMX-angereicherte Schlamm-biozönosen nach FISH mit der spezifischen Sonde für *Actinobacteria* (A) und *Chloroflexi* (B)

## FISH-Gruppensonden

Die dominanten Bakteriengruppen des Inokulums entsprechen mit Ausnahme der Gruppe der *Bacteroidetes* auch den dominanten Gruppen in den Schlamm-biozösen der drei Batch-Ansätze (Abb. 38). Die Gruppe der *Firmicutes* war sowohl im Inokulum als auch in den drei Batch-Ansätzen nur in geringer Anzahl vertreten. Zu den *Bacteroidetes* und *Firmicutes* gehören vor allem anaerobe Darmbakterien, die bei den hohen Sauerstoffkonzentrationen von 6-8 mg/l der Batch-Ansätze nicht überlebten.

In den Kontrollansätzen und den Versuchsansätzen 1 und 2 wurden in beiden Untersuchungsphasen *Betaproteobacteria* in hoher Anzahl gefunden, es zeigten sich dabei keine wesentlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen. Im Gegensatz dazu nahmen die *Gammaproteobacteria* in den SMX-angereicherten Schlamm-biozösen mit höheren SMX-Zugaben und der Zudosierung von SMX als einzige C- und N-Quelle (Phase 2) im Vergleich zur Kontrollbiozönose ab. Eine Zunahme bei Wachstum auf SMX war für die Bakteriengruppen *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria* und *Chloroflexi* zu beobachten. Eine höhere SMX-Zugabe als Cosubstrat (Ansatz 2, Phase 2) beeinflusste das Wachstum der *Alphaproteobacteria* positiv. Ein Anstieg der *Actinobacteria* (stäbchenförmiger Morphotyp, Abb. 39 A) wurde sowohl bei höheren SMX-Zugaben als Cosubstrat (Ansatz 3, Phase 1 und Ansatz 2, Phase 2) als auch bei der Zudosierung von SMX als einzige C- und N-Quelle (Ansatz 3, Phase 2) beobachtet. Für die *Chloroflexi*-Bakterien (fadenförmiger Morphotyp, Abb. 39 B) wurde eine signifikante Zunahme nur bei der Dosierung von SMX als einzige C- und N-Quelle (Ansatz 3, Phase 2) festgestellt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria* und *Chloroflexi* eine Rolle beim Abbau von SMX spielen können.

## PCR-DGGE und Sequenzierung von dominanten DGGE-Banden

Für die Domäne *Bacteria* und die Bakteriengruppen *Alpha*- und *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria* sowie *Chloroflexi*, die in der FISH-Analyse in hoher Anzahl gefunden wurden bzw. eine Zunahme in den SMX-angereicherten Schlamm-biozösen zeigten, wurden PCR-DGGE-Analysen durchgeführt.

Die DGGE-Profile für *Bacteria* zeigen auf, dass in den Kontrollansätzen und den SMX-dosierten Ansätzen im Vergleich zum Inokulum eine Abnahme der Diversität erfolgt. Dies kann auf die Verringerung des Substratspektrums in den Versuchen im Vergleich zu einer Kläranlage zurückgeführt werden. Im Gegensatz zu den FISH-Ergebnissen konnten in den DGGE-Profilen keine Unterschiede zwischen den einzelnen Batch-Ansätzen festgestellt werden. Hier zeigt sich die Limitierung der DGGE-Methode. Durch die zu hohe Vielfalt an Organismen innerhalb der Domäne *Bacteria* nahm die Sensitivität zur Detektion derjenigen Organismen ab, die nur in geringer Anzahl vorkommen. Das Fokussieren auf spezifische Gruppen innerhalb der Domäne *Bacteria* reduziert die Anzahl der Bakterienarten und erhöht die Empfindlichkeit der Nachweisgrenze (Gich et al., 2005, Muyzer und Smalla, 1998).

In Abbildung 40 sind die DGGE-Profile für die Gruppe der *Actinobacteria* (Abb. 40 A) und *Chloroflexi* (Abb. 40 B) dargestellt. Für die *Actinobacteria* wurde im Vergleich zum Inokulum eine extreme Abnahme der Diversität in allen Batch-Ansätzen, Kontrollansätzen und Ansätzen mit SMX-Dosierung beider Versuchsphasen beobachtet. Im Gegensatz zu den DGGE-Profilen der *Bacteria* bildet sich bei den *Actinobacteria* bei SMX-Zugabe eine dominante DGGE-Bande aus (rot markierte Bande), was auf die Selektion einer potentiell SMX abbauenden Bakterienart hinweist. Diese Banden wurden ausgeschnitten, amplifiziert, sequenziert und konnten als *Microbacterium* sp. identifiziert werden (Tab. 15). Im Gegensatz zu den *Actinobacteria* zeigte die *Chloroflexi*-Gruppe in allen untersuchten Schlamm-biozösen eine hohe Diversität und es fand nur eine geringe Populationsverschiebung aufgrund der Kultivierungsbedingungen und SMX-Zugaben statt. Dieses Ergebnis weist daraufhin, dass Bakterien innerhalb der *Chloroflexi* auf SMX wachsen können und es sich dabei um potentielle SMX-Abbauer handelt. Dies wird durch die quantitative FISH-Analyse bestätigt, die eine Zunahme dieser Gruppe in den Ansätzen mit SMX als einzige C- und N-Quelle feststellte. Die Sequenzierung verschiedener



Banden der Schlammbiozönosen, die mit SMX als einzige C- und N-Quelle kultiviert wurden, sollte Informationen liefern, welche *Chloroflexi*-Arten hierfür verantwortlich sind (Tabelle 15). Die vergleichende Sequenzanalyse zeigte auf, dass es sich um verschiedene nicht kultivierbare *Chloroflexi*-Bakterien handelt.

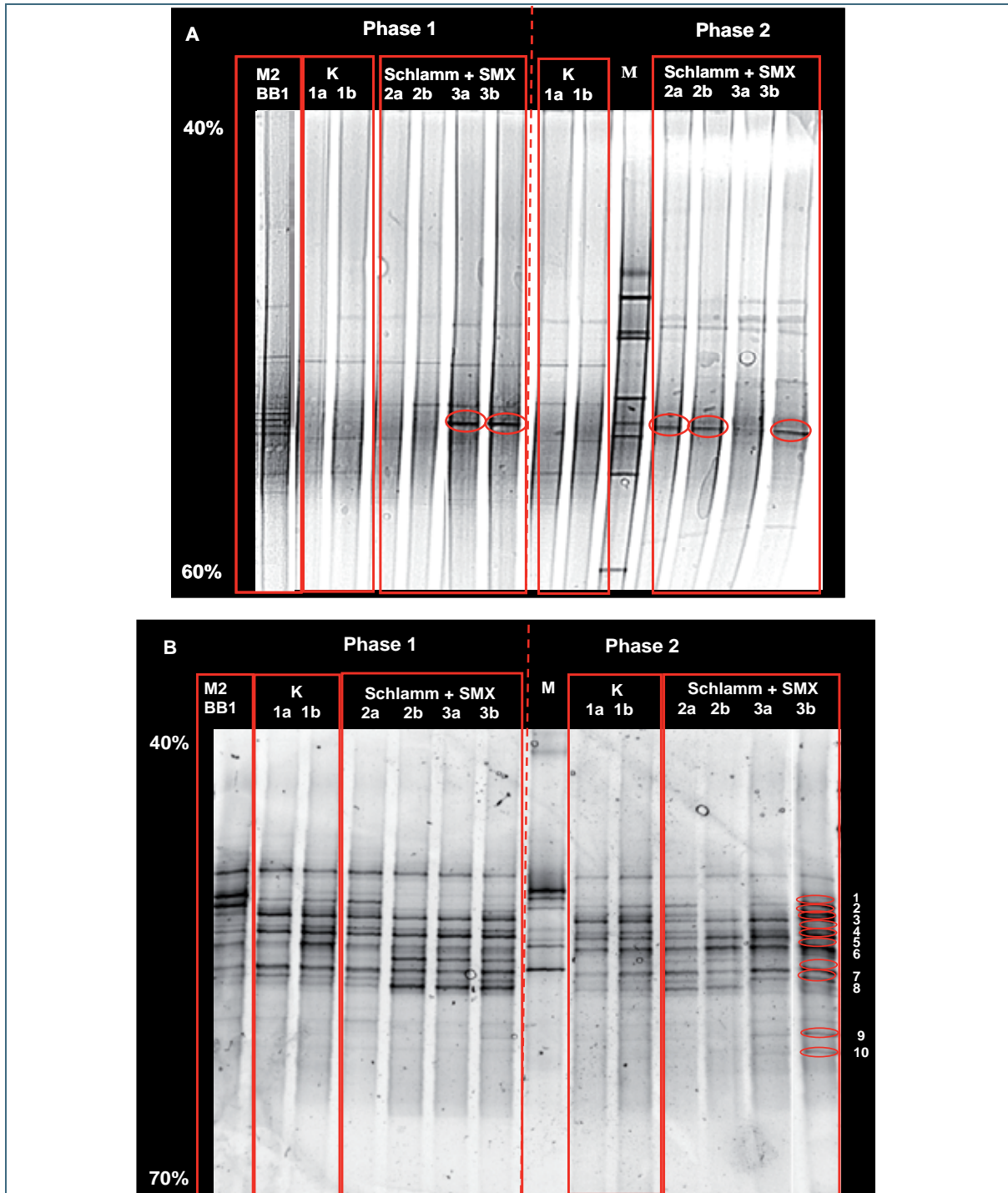


Abb. 40: DGGE-Profile der Bakteriengruppen *Actinobacteria* (A) und *Chloroflexi* (B) für das Inokulum (M2, BB1) und die Biozönosen der der Ansätze des Batch-Versuches (KA-1 = Kontrollansatz, VA-2 und VA-3 Versuchsansätze mit SMX) am Ende der Adaptionsphase (Phase 1) und der Versuchsphase (Phase 2); M = Marker

Tab. 15: Phylogenetische Zuordnung der DGGE-Banden-Sequenzen (Teilsequenz der 16S rDNA , 200-500 bp) mit Hilfe der BLAST-Analyse (Basic Local Alignment Search Tool, www.ncbi.nlm.nih.gov, Altschul et al., 1990)

DGGE Banden	Taxonomische Zuordnung	nächster Verwandter (Accession-Nr.)	max. Identität [%]
Dominante Banden A3a/b Phase 1 A2a/b A3a/b Phase 2	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacterium</i> spp. (EF540477) <i>Microbacterium aurum</i> (FJ200411)	99 98
Bande 1 A3b Phase 2	<i>Chloroflexi</i>	unkultiviertes Bakterium (AY491572) unkultiviertes <i>Chloroflexi</i> -Bakterium (FM253630)	100 93
Bande 2 A3b Phase 2	<i>Chloroflexi</i>	unkultiviertes Bakterium (AY491572) unkultiviertes <i>Chloroflexi</i> (FM253630)	95 90
Bande 3 A3b Phase 2	<i>Chloroflexi</i>	unkultiviertes Bakterium (AB286398) unkultiviertes <i>Chloroflexi</i> -Bakterium (FJ484890)	97 97
Bande 4 A3b Phase 2	<i>Chloroflexi</i>	unkultiviertes <i>Chloroflexi</i> -Bakterium (FJ484890) unkultiviertes <i>Chloroflexi</i> -Bakterium (EF142042)	98 98
Bande 5 A3b Phase 2	<i>Chloroflexi</i>	unkultiviertes <i>Chloroflexi</i> -Bakterium (AY326634)	93
Bande 6 A3b Phase 2	<i>Chloroflexi</i>	unkultiviertes <i>Chloroflexi</i> -Bakterium (AY5001069)	94
Bande 9 A3b Phase 2	<i>Chloroflexi</i>	<i>Kouleothrix aurantiaca</i> , <i>Chloroflexi</i> (AB079639)	94
Bande 10 A3b Phase 2	<i>Chloroflexi</i>	unkultiviertes Bakterium (DQ084323) <i>Kouleothrix aurantiaca</i> , <i>Chloroflexi</i> (AB079639)	93 91
dominante Bande A2a	<i>Betaproteobacteria</i> <i>Rhodocyclaceae</i>	unkultiviertes Bakterium (EF367341) <i>Azoarcus</i> sp. (EU331394)	100 97
dominante Bande A2b	<i>Betaproteobacteria</i> <i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Sterolibacterium</i> sp. (AM421798)	100
dominante Banden A2a/b, A3a/b	<i>Betaproteobacteria</i> <i>Comamonadaceae</i>	<i>Variovorax</i> sp. (FJ750461) <i>Acidovorax</i> sp. (AF078763)	100
dominante Bande A3a/b	<i>Betaproteobacteria</i> <i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Zoogloea</i> sp. (DQ413172)	100
dominante Bande A2a/b	<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Paracoccus</i> sp. (AY167832)	99
dominante Bande A2a/b, A3a/b	<i>Alphaproteobacteria</i>	unkultiviertes <i>Alphaproteobacterium</i> (EF663317)	99

Aufgrund der meist niedrigen Sequenzähnlichkeiten zu in der Literatur beschriebenen Bakterien (< 97% max. Identität) konnte keine eindeutige taxonomische Zuordnung zu bekannten *Chloroflexi*-Bakterien vorgenommen werden. Das Fehlen von ausreichenden 16S rDNA Sequenzdaten für die Gruppe der *Chloroflexi* limitiert derzeit die taxonomische Bestimmung auf Gattungs- und Artebene und ermöglicht lediglich die Zuordnung zum Phylum *Chloroflexi*. Für eine genaue phylogenetische Bestimmung dieser relevanten *Chloroflexi*-Bakterien bräuchte man folglich Reinkulturen, um pheno- und genotypische Untersuchungen durchzuführen zu können (polyphasische Analyse, Vandamme et al., 1996). Es ist aber bekannt, dass Bakterien der *Chloroflexi*-Gruppe schwer zu kultivieren sind (vgl. Tab. 15), was zur Folge hat, dass ausreichende Daten für die taxonomische Charakterisierung bislang fehlen. Auch in dieser Arbeit konnten keine *Chloroflexi*-Reinkulturen gewonnen werden (vgl. Tab. 14).

Die DGGE-Profile der *Beta*- und *Alphaproteobacteria* weisen verschiedene dominante Banden in den SMX-angereicherten Schlammbiozöosen auf, die in den Kontrollansätzen ohne SMX nicht detektiert worden sind. Die Sequenzanalyse dieser Banden identifizierte die Gattungen *Azoarcus*, *Sterolibacter*, *Variovorax*, *Acidovorax* und *Zoogloea* innerhalb der *Betaproteobacteria* sowie *Paracoccus* innerhalb der *Alphaproteobacteria*. Inwieweit diese Bakteriengattungen die Fähigkeit besitzen SMX abzubauen, muss durch gezielte SMX-Abbauversuche geprüft werden.

Eine Sequenzähnlichkeitsanalyse der dominanten DGGE-Banden mit den Reinkulturen zeigte eine 100% Sequenzähnlichkeit für *Zoogloea oryzae* und *Microbacterium* sp., und 98% Sequenzähnlichkeit für *Paracoccus* sp.. Diese Ergebnisse bestätigen die Bedeutung dieser Organismen für den biologischen SMX-Abbau, da sie mit zwei unabhängigen Methoden in den SMX abbauenden Biozöosen nachgewiesen wurden. Allerdings erhält man erst durch die in situ-Detektion mit FISH eine quantitative Aussage über die Präsenz dieser Organismen in den untersuchten Schlammbiozöosen.

### FISH mit spezifischen Gensonden zum Nachweis potentieller SMX-Abbauer

Aufgrund der FISH-Ergebnisse mit Gruppensonden spielen folgende Bakteriengruppen bei dem SMX-Abbau eine potentielle Rolle: *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Chloroflexi* und *Actinobacteria*. Die Sequenzierung der dominanten DGGE-Banden und die Identifizierung von Reinkulturen zeigten, dass die Gattungen *Zoogloea*, *Paracoccus*, *Brevundimonas* und *Gordonia* innerhalb dieser Gruppen relevant sein könnten. Deswegen wurde FISH mit spezifischen Sonden für diese Gattungen eingesetzt, um deren Vorkommen in den Batch-Schlamm zu quantifizieren (Abb. 41).

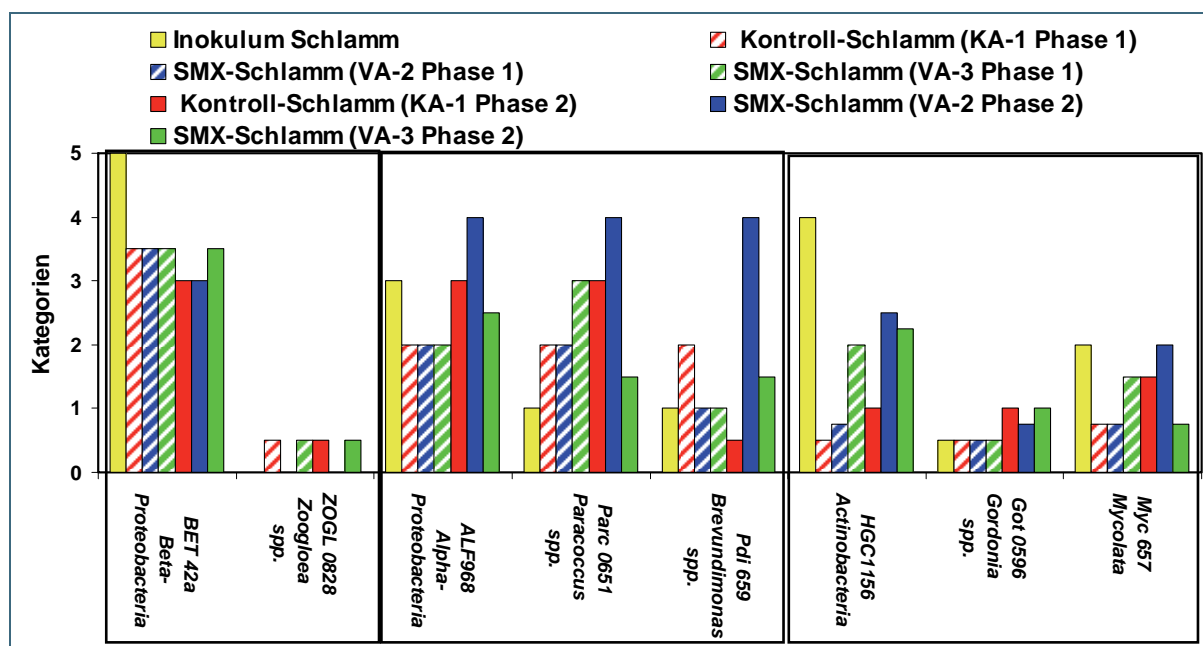


Abb. 41: In situ-Nachweis der Gruppen *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Mycolata* sowie der Gattungen *Zoogloea*, *Paracoccus*, *Brevundimonas* und *Gordonia* in den Biozöosen des Inokulums (Belebtschlamm, KBA-M2, BB1) sowie der Ansätze des Batch-Versuches (KA-1 = Kontrollansatz, VA-2 und VA-3 Versuchsansätze mit SMX) am Ende der Adaptionsphase (Phase 1) und der Versuchsphase (Phase 2) mit FISH

Innerhalb der *Betaproteobacteria* repräsentieren die *Zoogloea* spp. einen sehr niedrigen Anteil in allen Batch-Schlamm, was darauf schließen lässt, dass diese Gattung wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle im SMX-Abbau spielt. Im Gegensatz dazu korreliert die Zunahme der *Alphaproteobacteria* in den Schlammbiozöosen, die mit SMX als Cosubstrat inkubiert wurden, mit der Anreicherung der beiden Gattungen *Paracoccus* und *Brevundimonas*. Innerhalb der *Actinobacteria* wurden sowohl *Gordo-*

*nia* spp. als auch die Gruppe der Mycolata, zu der die Gattungen *Gordonia* und *Mycobacterium* gehören, in allen untersuchten Schlämmen detektiert. In den Schlamm-biozösen, die mit höheren SMX-Konzentrationen als Cosubstrat und mit SMX als einzige C- und N-Quelle kultiviert wurden, liegt die Detektionsrate für *Gordonia* und Mycolata aber deutlich niedriger als für die Gruppe der *Actinobacteria*. Das weist darauf hin, dass innerhalb der *Actinobacteria* nicht Bakterien der Mycolata-Gruppe eine wichtige Rolle spielen.

Die FISH-Ergebnisse mit spezifischen Sonden zeigen, dass innerhalb der Gruppe der *Alphaproteobacteria* *Paracoccus*- und *Brevundimonas*-Arten potentielle SMX-Abbauer darstellen. Im Gegensatz dazu ist innerhalb der *Betaproteobacteria* bzw. *Actinobacteria* den *Zoogloea* spp. bzw. der Mycolata-Gruppe aufgrund ihrer niedrigen Detektionsrate in SMX-angereicherten Schlämmen nur eine geringere Bedeutung im SMX-Abbau zuzusprechen. Hier sind also offenbar andere Gattungen verantwortlich für die SMX-Elimination. Die PCR-DGGE-Sequenzierungsergebnisse lassen vermuten, dass hier die Gattungen *Azoarcus*, *Sterolibacter* und *Variovorax* innerhalb der *Betaproteobacteria* sowie die Gattung *Microbacterium* innerhalb der *Actinobacteria* eine wichtigere Rolle spielen.

#### 4.3.4 SMX-Abbaupotential von Reinkulturen

Für gezielte Abbautests wurde ein Bakterienkonsortium eingesetzt, das sich aus 10 Reinkulturen (siehe Tab. 14) der Gattungen *Paracoccus* (2 verschiedene Arten), *Brevundimonas*, *Zoogloea*, *Pseudomonas* (3 verschiedene Arten), *Vibrio*, *Gordonia* und *Mycobacterium* zusammensetzte.

Während einer Vorinkubation mit Acetat, Ammoniumnitrat und SMX zeigte das Konsortium ein deutliches Wachstum und das zudosierte SMX von 10 mg/l wurde nach 24 d Inkubation vollständig eliminiert. Durch diesen Vorversuch wurden die Bakterien durch die Zugabe von Acetat in einen aktiven Zustand überführt. Zudem konnte sich die Biozönose durch die Zugabe von SMX vor dem eigentlichen Abbauersuch an das Antibiotikum adaptieren.

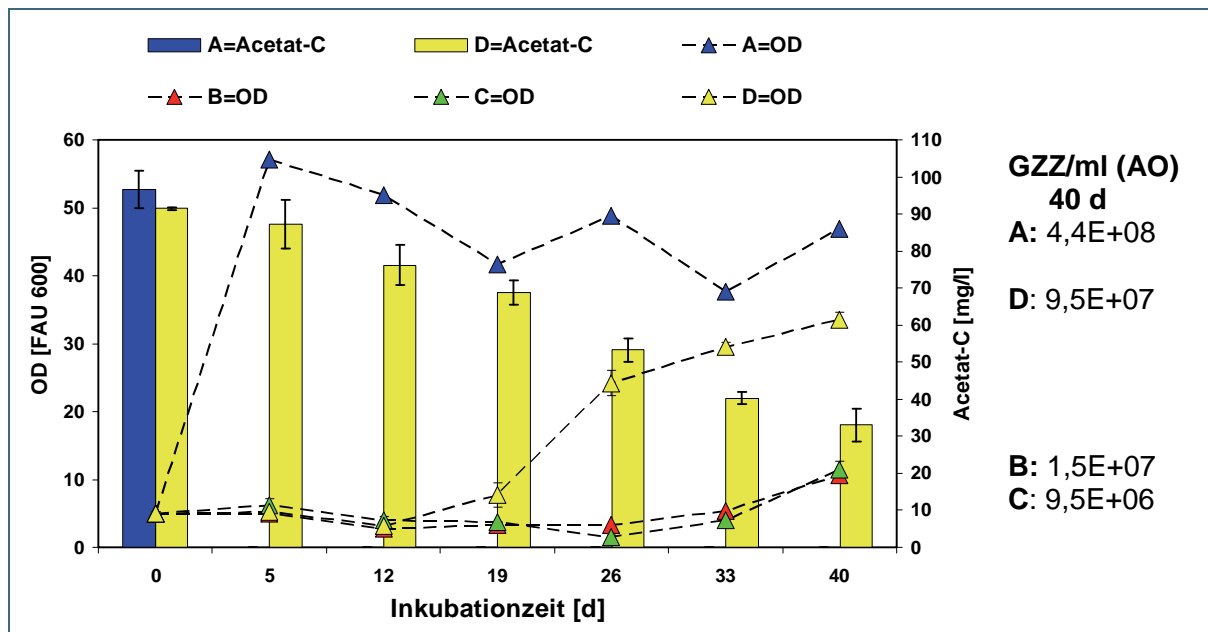


Abb. 42: Biomasseentwicklung gemessen als optische Dichte (OD, Mittelwerte der 3 Parallelansätze mit der korrespondierenden Standardabweichung) in den vier Versuchsansätzen A (Acetat, Ammoniumnitrat und SMX), B (SMX, Ammoniumnitrat), C (SMX) und D (Acetat und SMX); Gesamtzellzahl (GZZ nach 40 d Inkubation, AO = Acridinorange) sowie die Acetatkonzentrationen (Mittelwerte der 3 Parallelansätze mit der korrespondierenden Standardabweichung) der Versuchsansätze A und D

Während des Hauptversuchs setzte das Wachstum im Ansatz A, der neben SMX Acetat als weitere Kohlenstoff- sowie Ammoniumnitrat als Stickstoffquelle enthielt, am schnellsten ein und erreichte das Maximum nach 5 d Inkubation, um dann in die stationäre Phase überzugehen (Abb. 42). Das Wachstum steht in enger Beziehung mit der Verfügbarkeit von Acetat (Abb. 42), welches nach 5d vollständig verbraucht ist. Im Ansatz D, der sich vom Ansatz A durch das Fehlen einer weiteren Stickstoffquelle neben SMX im Medium unterscheidet, war eine Biomassezunahme erst nach einer 15-tägigen lag-Phase mit einem kontinuierlichen Anstieg bis zum Ende des Versuchs zu beobachten. Im Vergleich zum Ansatz A wurden hier jedoch deutlich niedrigere Zellzahlen pro ml bestimmt (siehe Abb. 42, Gesamtzellzahl/ml gemessen nach 40 d). Das positive Wachstum der Bakterien im Ansatz D ab dem Tag 19 bis zum Tag 40 geht einher mit der Verfügbarkeit von Acetat, das bis Versuchsende nicht aufgebraucht ist, d.h. die Abnahme von Acetat korreliert mit der Zunahme der Biomasse. Bei Abbruch des Versuches (Tag 40) war auch in den Ansätzen B (SMX und Ammoniumnitrat ohne weitere C-Quelle) und C (SMX als C- und N-Quelle) ein geringes Wachstum zu beobachten. In den Kontrollansätzen, die mit Bakterienkulturen angeimpft wurden ohne Zugabe von SMX, erfolgte nur in dem Ansatz mit Acetat und Ammoniumnitrat eine Biomassezunahme. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass in den Ansätzen B, C und D die positive Biomasseentwicklung auf die Nutzung von SMX als C- und/ oder N-Quelle zurückzuführen ist. Dies wird durch die SMX-Elimination, die in allen Ansätzen nach unterschiedlich langen Adaptionsphasen 100% erreicht, bestätigt (Abb. 43). Dass es sich hierbei wirklich um eine bakterielle Metabolisierung handelt, wird durch abiotische Kontrollen, in denen keine SMX-Reduzierung festgestellt werden konnte, verifiziert. Am frühesten setzte der SMX-Abbau im Ansatz D ein (Tag 19), in dem SMX bereits nach 26 d Kultivierung im Medium nicht mehr nachweisbar war. Im Gegensatz dazu erfolgte in den Ansätzen B und C erst nach 33 d Kultivierung eine signifikante Abnahme der SMX-Konzentrationen bzw. eine vollständige SMX-Eliminierung nach 40 d. Im Ansatz A wurde erst am letzten Versuchstag (40 d) eine Reduzierung des SMX-Gehaltes gemessen. Es zeigte sich, dass die Bakterien hier eine relativ lange Adaptionsphase (35 d) benötigen, um nach Verbrauch des zudosierten Acetats und Ammoniumnitrats SMX als einzige C- und N-Quelle nutzen zu können.

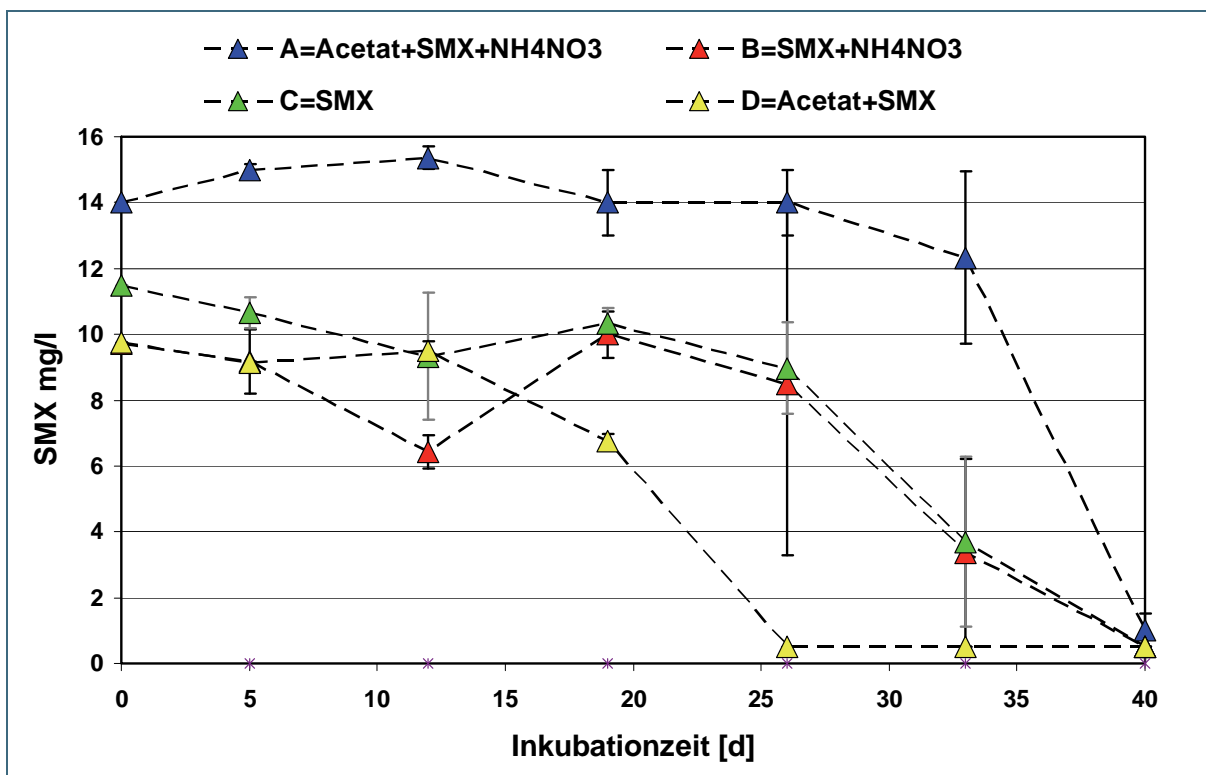


Abb. 43: SMX-Konzentrationen (Mittelwerte der 3 Parallelansätze mit der korrespondierenden Standardabweichung) der vier Versuchsansätze A (Acetat, Ammoniumnitrat und SMX), B (SMX, Ammoniumnitrat), C (SMX) und D (Acetat und SMX)

In den Ansätzen B, C und D setzte mit der beginnenden SMX-Reduzierung das bakterielle Wachstum ein (vgl. Abb. 42 und Abb. 43). Dies bestätigt a) eine bakterielle SMX-Metabolisierung und b) die Nutzung von SMX als C-Quelle in Anwesenheit von Ammoniumnitrat (Ansatz B), die Nutzung von SMX als N-Quelle bei gleichzeitiger Verfügbarkeit von Acetat (Ansatz D) sowie die Nutzung von SMX als einzige C- und N-Quelle (Ansatz C). Weiter erfolgt eine schnellere SMX-Elimination bei N-Mangel und gleichzeitiger Verfügbarkeit einer leicht abbaubaren C-Quelle zur Energieversorgung. Bei Energiemangel hingegen kommt es zu einer deutlichen Verzögerung der SMX-Eliminationsleistung.

#### 4.3.5 Nachweis von Sulfonamid-Resistenzgenen

Der Nachweis von spezifischen Sulfonamid-Resistenzgenen mit der PCR-Technik liefert (1) eine Aussage über das Vorkommen von SMX-resistenten Bakterien und (2) Informationen über den Resistenzmechanismus. Sulfonamide blockieren die Folsäuresynthetase, was zu einer Hemmung der Folsäuresynthese in den Bakterien führt. Da Folsäure ein entscheidender Cofaktor in der Nukleinsäurebiosynthese (DNA und RNA) darstellt, wird durch das Fehlen der Folsäure die gesamte Proteinbiosynthese in der Bakterienzelle gehemmt. Die Bakterien sind nicht mehr fähig sich zu vermehren. Die in der Literatur beschriebenen Sulfonamid-Resistenzgene Sul1, Sul2 und Sul3 codieren für die Entwicklung einer alternativen Folsäuresynthetase, die nicht von den Sulfonamiden gehemmt wird (Perreten und Boerlin, 2003, Skold, 2000). Diese Gene befinden sich auf Plasmiden, das sind mobile nicht-chromosomale ringförmige DNA-Moleküle. Im Gegensatz zu chromosomalen Gensträngen, die nur durch Zellteilung (vertikaler Gentransfer) in weitere Bakterien übertragen werden können, werden Plasmide häufig durch horizontalen Gentransfer auch über Artgrenzen hinweg übertragen. Dies kann bei Plasmid-codierten Resistenzgenen eine verstärkte Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen bewirken. In diesem Projekt wurde das Vorkommen von in der Literatur beschriebenen Sulfonamidresistenzgenen in Kläranlagensystemen untersucht. Deren Quantifizierung ermöglicht eine Risikoabschätzung des potentiellen Eintrags in die Umwelt durch (1) den Kläranlagenablauf und (2) den Klärschlamm, wenn dieser zur Düngung von landwirtschaftlich genutzten Flächen verwendet wird.

Tab. 16: Sulfonamid-Resistenzgene in den einzelnen Kläranlagen-Kompartimenten (RohAW = Rohabwasser, BB1 = Hochlaststufe, BB2 = Niedriglaststufe, BS = Belebtschlamm) in den Anlagen KBA-M2 (konventionelle zweistufige Belebungsanlage) und MBA-MH (einstufige Membranbelebungsanlage)

Sulfonamid-Gene	KBA-M2, September 08						
	RohAW	Zulauf BB1	BS BB1	Zulauf BB2	BS BB2	Ablauf vor UV	Ablauf nach UV
Sul(I)	+	+	+	+	+	+	+
Sul(II)	+	+	+	+	+	+	+
Sul(III)	+	+	+	+	+	+	+
Sulfonamid-Gene	MBA-MH, Oktober 08						
	RohAW	Zulauf BB	BS	BS-Überstand	Ablauf		
Sul(I)	+	+	+	+	+		
Sul(II)	+	+	+	+/-	-		
Sul(III)	+	+	+	-	-		

Der Nachweis der beschriebenen drei Sulfonamid-Resistenzgene erfolgte mit drei von Pei et al. (2006) beschriebenen Primerpaaren. In Tabelle 16 ist das Auftreten dieser Resistenzgene für die Kläranlagen-Kompartimente der beiden Kläranlagen KBA-M2 und MBA-MH dargestellt. Es zeigte sich, dass alle drei Sulfonamid-Resistenzgene in allen untersuchten Proben der KBA-M2 detektiert wurden. In der MBA-MH hingegen trat lediglich das Sul1-Gen in allen untersuchten Kläranlagen-Kompartimen-

ten auf. Im Gegensatz dazu wurden die Gene Sul2 und Sul3 eindeutig nur noch im Rohabwasser, im Zulauf Belebung und im Ablauf detektiert. Vergleichbare Ergebnisse wurden von anderen Arbeitsgruppen in Boden und Sedimentproben gefunden (Pei et al., 2006, Schmitt et al., 2006). Auch in diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das Sul1 Gen in allen untersuchten Kompartimenten vorkommt und die Gene Sul2 und Sul3 eine selektive Präsenz aufweisen.

Der positive Nachweis der beschriebenen Gene in den untersuchten Kläranlagenabläufen weist auf ein Eintragsrisiko für die aquatische Umwelt hin. Hier sind allerdings zur Berücksichtigung von Verdünnungseffekten zusätzliche Untersuchungen direkt im Gewässer notwendig. Das Vorkommen von Sulfonamid-Resistenzgenen in den untersuchten Schlämmen könnte ein potentielles Umweltrisiko bei der Ausbringung von Klärschlamm auf landwirtschaftlich genutzte Flächen darstellen. Inwieweit die Sul-Gene sich im Faulschlamm erhalten, ist Gegenstand aktuell laufender Untersuchungen (Schmied, Bachelor-Arbeit in Bearbeitung).

#### 4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

##### **Elimination von Sulfamethoxazol in kommunalen Belebungsanlagen mit Zweistufen- und Membranverfahren**

Das Antibiotikum SMX und sein Humanmetabolit Ac-SMX, der in der Kanalisation oder Kläranlage durch Deacetylierung in die Ursprungssubstanz rücktransformiert wird, wurden in beiden Anlagen deutlich reduziert. Die im Vergleich zur konventionellen Belebungsanlage höhere Eliminationsleistung der Membrankläranlage ist auf deren höheres Schlammalter zurückzuführen. Durch die längere Verweilzeit des Schlammes im Belebungsbecken erfolgt eine gute Adaption der Biozönose an die Abwasserinhaltsstoffe. Darüber hinaus ist im Gegensatz zu einer konventionellen Anlage, bei der ein hohes Schlammalter systembedingt mit einer geringen Schlammaktivität einhergeht, der Membranschlamm trotz seiner langen Aufenthaltszeit sehr aktiv. Das macht auch den Abbau schwerer abbaubarer Verbindungen wie SMX wahrscheinlicher.

Die Adsorption von SMX an den Schlämmen liegt mit etwa 1% ähnlich niedrig wie in Literaturangaben. Sorptionsprozesse spielen folglich nur eine sehr geringe Rolle und es kann davon ausgegangen werden, dass die SMX-Reduzierung in der Belebungsstufe hauptsächlich über einen biologischen Abbau erfolgt.

##### **Abbau von Sulfamethoxazol in Belebtschlamm im Batch-Versuch**

Belebtschlammversuche zur Anreicherung von SMX-abbauenden Mikroorganismen durch semikontinuierliche Zugabe von SMX als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle oder als Cosubstrat bzw. mit einer zusätzlichen Stickstoffquelle zeigten, dass die Schlammbiozönosen SMX grundsätzlich als C- und N-Quelle für ihr Wachstum nutzen können. Niedrigere DOC-Eliminationsraten der Versuchsansätze mit SMX im Vergleich zum Kontrollansatz zeigen deutlich, dass SMX – trotz einer z.T. 100%igen Elimination – nicht vollständig mineralisiert wird. Der in der Literatur beschriebene Metabolit 3-Amino-5-methyl-isoxazol wurde in den Versuchsansätzen bereits nach 2 Wochen korrelierend mit der beginnenden SMX-Elimination nachgewiesen und reicherte sich während der Kultivierung im System an. Weitere potentielle Abbauprodukte wie 5-Methyl-isoxazol und Isoxazol konnten nicht detektiert werden. Vermutlich repräsentiert 3-Amino-5-methyl-isoxazol auch in den vorliegenden Untersuchungen einen stabilen Metaboliten, dessen weiterer Abbau unter den hier untersuchten Umweltbedingungen Aerobie und Raumtemperatur unwahrscheinlich ist.

### **Abbau von Sulfamethoxazol im Konsortium SMX-abbauender Bakterien**

Versuche mit Zugabe von SMX als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle oder als Cosubstrat bzw. mit einer zusätzlichen Stickstoffquelle bestätigen für ein Konsortium SMX-abbauender Bakterienisolate aus der Anreicherungskultur des Batchversuches a) eine bakterielle SMX-Metabolisierung, b) die Nutzung von SMX als C-Quelle in Anwesenheit von Ammoniumnitrat als N-Quelle, c) die Nutzung von SMX als N-Quelle bei gleichzeitiger Verfügbarkeit von Acetat sowie d) die Nutzung von SMX als einzige C- und N-Quelle. Weiter erfolgt eine schnellere SMX-Elimination bei N-Mangel und gleichzeitiger Verfügbarkeit einer leicht abbaubaren C-Quelle zur Energieversorgung.

Diese Ergebnisse könnten einige der in der Literatur widersprüchlichen Angaben zum SMX-Abbau aufklären. Überträgt man die Abbau-Ergebnisse auf die Verhältnisse in Kläranlage oder Umwelt, bedeutet dies, dass ein Abbau in organisch belastetem Milieu effektiver sein sollte als in kohlenstoffarmer Umgebung. Energiemangel hingegen verzögert die SMX-Elimination deutlich. Das könnte erklären, warum Nitrifikationsstufen, die unter sehr niedriger BSB-Belastung gefahren werden müssen, weniger effektiv SMX eliminieren als Hochlaststufen (Perez et al. 2005).

Daneben wird der SMX-Abbau insbesondere bei Mangel an Stickstoff befördert. Im Kläranlagenbereich finden sich solche Zonen etwa in Denitrifikationsstufen mit Dosierung einer externen leicht abbaubaren Kohlenstoffquelle wie z.B. bei der methanolgestützten Denitrifikation in den Sandfiltermodulen unserer zweistufigen Anlage. Auch im anoxischen Bodenbereich mit ausreichend verfügbaren Energiequellen ist dann ein guter SMX-Abbau denkbar (vgl. auch Jekel und Grünheid, 2007). Dabei sollte aufgrund der Verfügbarkeit an C-Quellen der SMX-Abbau besser in Böden mit hohem Gehalt an organischen Substanzen gelingen als in mineralischen. Der gute SMX-Abbau unter Stickstoffmangelbedingungen weist darauf hin, dass sich in überdüngtem Boden mit einem hohen N-Gehalt der SMX-Abbau verzögern könnte.

Lange Adaptionszeiten deuten darauf hin, dass eine Erhöhung des Schlammalters einer Kläranlage zu einer besseren Adaption der Biozönose führt. Diese Maßnahme ist jedoch nur dort zielführend, wo die Stoffwechselaktivität der Biomasse noch hoch ist, z.B. in Membrananlagen (s.o.; vgl. Göbel et al., 2007). Aufgrund der langen Adaptionszeiten ist davon auszugehen, dass ein SMX-Abbau dort erschwert ist, wo stark schwankende Abwassermengen und/oder Arzneimittelkonzentrationen vorliegen, z.B. in Anlagen mit geringer Einwohnerzahl.

### **Taxonomie und Biologie SMX-abbauender Bakterienisolate**

Für den Vergleich der Biozönosen in den SMX-Abbau-Versuchen mit Belebtschlamm mit ihrem Inokulum aus der Hochlaststufe einer zweistufigen Anlage wurden die molekularbiologischen Methoden Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) mit der Polymerase-Ketten-Reaktion und der Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (PCR-DGGE) kombiniert. Dabei war das Ziel, "Indikatororganismen" für den SMX-Abbau zu finden. Der Nachweis einer Elimination bestimmter Bakterienarten durch den direkten "antibiotischen" Einfluss von SMX kann dabei nicht geführt werden, da SMX als Breitbandantibiotikum auf eine Vielzahl unterschiedlicher Bakterien bakteriostatisch wirkt, d.h. sie in ihrem Wachstum hemmt. Darüber hinaus sind artübergreifend Resistenzgene weit verbreitet. Die beschriebenen Populationsverschiebungen beziehen sich also nur auf den Einfluss von Versuchsbedingungen und die potentielle Nutzung von SMX als Kohlenstoff – und/oder Stickstoffquelle.

Die Diversität der Biozönose im Versuch im Vergleich zum Inokulum verringerte sich zunächst, wohl aufgrund des im Versuch weniger vielfältigen Substratangebots im Vergleich zum Belebungsbecken. Weiter führte die hohe Sauerstoffkonzentration in den Versuchen zu einer Populationsverschiebung weg von den anaeroben Gruppen *Firmicutes* und *Bacteroidetes*, denen viele Darmbakterien zugeordnet sind. Die SMX-Zugabe führte bei den *Betaproteobacteria* nicht zu signifikanten Unterschieden im



Vergleich zur SMX-freien Kontrolle, *Gammaproteobacteria* hingegen nahmen im SMX-Versuch ab. Eine deutliche Zunahme aufgrund der SMX-Dosierung ergab sich für die *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria* und *Chloroflexi*. Als für den SMX-Abbau relevant erwiesen sich neben diesen Bakteriengruppen auch Pilze. Innerhalb der *Actinobacteria* entwickelte sich eine geringe Diversität. FISH-Untersuchungen zeigten, dass die Gruppe der Mycolata, repräsentiert durch die beiden Gattungen *Gordonia* und *Mycobacterium*, weniger relevant erscheint als die in Ansätzen mit hohem SMX-Eintrag  $\geq 10$  mg/l SMX dominierende Gattung *Microbacterium*. Die *Chloroflexi* zeigten eine hohe Diversität innerhalb der SMX-abbauenden Biozöosen. Das Fehlen von ausreichenden Sequenzdaten in den verfügbaren Datenbanken erschwerte die Zuordnung von SMX-Abbauern dieser Gruppe zu einzelnen Gattungen. Vergleichende Sequenzanalysen identifizierten weitere Gattungen von potentiellen SMX-Abbauern: in der Gruppe der *Alphaproteobacteria* erscheinen die Gattungen *Paracoccus* und *Brevundimonas* als wichtige SMX-Abbauer, bei den *Betaproteobacteria* spielt die Gattung *Zoogloea* eine untergeordnete Rolle, evtl. sind hier andere Gattungen wie *Azoarcus*, *Sterolibacter* und *Variovorax* von höherer Relevanz.

Da der Abbau von SMX vor allem unter Präsenz einer leicht zugänglichen Energiequelle, d.h. insbesondere in organisch belastetem Milieu und nicht in kohlenstoffarmer Umgebung, effektiv erfolgt, macht das auch die Relevanz von *Actinobacteria* verständlich, die unterschiedlichste Kohlenstoffquellen auch in hohen Konzentrationen und auch cometabolisch nutzen können. Bakterien der Gattung *Paracoccus* aus den *Alphaproteobacteria* sind zusätzlich noch in der Lage, C1-Kohlenstoffquellen zu nutzen, was ihnen einen weiteren Vorteil für die flexible Verwertung ausgefallener Kohlenstoffquellen als Cosubstrat bietet.

Die Zunahme von Bakterien der *Chloroflexi* bei SMX-Zugabe als alleinige C- und N-Quelle könnte auf deren Bedeutung im oberflächennahen Bodenbereich und im durchleuchteten Gewässer hindeuten, da diese phototroph sind, d.h. sie ihre Stoffwechselenergie durch Photosynthese gewinnen.

### **Auftreten von Sulfonamid-Resistenzgenen in Kläranlagenkompartimenten**

Erste Untersuchungen zur Ermittlung des Auftretens der Plasmid-codierten Sulfonamid-Resistenzgene Sul1-3 in Kläranlagenkompartimenten zeigten, dass das Sul1-Gen in allen untersuchten Kompartimenten vorkommt und die Gene Sul2 und Sul3 eine selektive Präsenz aufweisen. Der positive Nachweis in Kläranlagenabläufen weist auf ein Eintragsrisiko für die aquatische Umwelt hin. Hier sind allerdings zur Berücksichtigung von Verdünnungseffekten zusätzliche Untersuchungen direkt im Gewässer notwendig. Das Vorkommen von Sulfonamid-Resistenzgenen im Schlamm könnte ein potentielles Umweltrisiko bei der Ausbringung von Klärschlamm auf landwirtschaftlich genutzte Flächen darstellen. Einer realistischen Risikoabschätzung wird man allerdings erst dann näherkommen, wenn Sul-Gene direkt im Faulschlamm und im Gewässer verlässlich nachgewiesen und quantifiziert sowie mit den leider noch spärlichen Literaturdaten in Beziehung gesetzt werden. Diese Forschungsschwerpunkte sind Gegenstand aktuell laufender Untersuchungen.

### **Ausblick**

Zum Nachweis des tatsächlichen SMX-Abbaus müsste in Folgeuntersuchungen der in situ Nachweis potentieller SMX-Abbauer in Kläranlagenkompartimenten, in Oberflächengewässern und Sedimenten sowie Lysimetersäulen erfolgen, in denen analytisch eine SMX-Elimination nachgewiesen werden konnte.

Die bisherigen Untersuchungen zum SMX-Abbau erfolgten im Aeroben bei 20°C. Folgeuntersuchungen könnten das Verhalten auch für andere Redox- und Temperaturbereiche aufklären und so optimale Bedingungen für die biologische SMX-Elimination definieren.

Die vorliegenden Untersuchungen erfolgten mit Belebtschlamm und Bakterien in Suspension, was zu relativ langen Adaptionzeiten führte. Es ist bekannt, dass Bakterien in Biofilmen, d.h. einem Aufwuchs von Mikroorganismen auf Grenzflächen, oft effektiver im Schadstoffabbau sind. Dies wurde auch schon mit Wasser-Sedimenttests gezeigt. Folgeuntersuchungen zum Abbau von Mikroschadstoffen sollten daher schwerpunktmäßig mit Bakterien im Biofilm erfolgen.

## 5 Literatur

Agerso, Y., Petersen, A. (2007): The tetracycline resistance determinant Tet 39 and the sulphonamide resistance gene *sulII* are common among resistant *Acinetobacter* spp. isolated from integrated fish farms in Thailand. *J. Antimicrobial Chemotherapy* **59**(1), 23-27.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.

Amann, R.L. (1995): In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In: Molecular Microbial Ecology Manual. Akkerman, A.D.L., van Elsas, J.D., de Bruijn, F.J. (eds), pp. 1-15. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Andreozzi, R., Marotta, R., Pinto, G., Pollio, G. (2002): Carbamazepine in water: Persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. *Wat. Res.* **36**, 2869-2877.

Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P. (2003): Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* **50**, 1319-1330.

Arbeiter, A. (2008): Der Effekt des Antibiotikums Sulfamethoxazol auf die Abwasserbiozönose. Diplomarbeit, Studiengang Biologie, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt / Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft, Technische Universität München.

Arzneimittelkursbuch (1999/2000): Fakten und Vergleiche für mehr als 12.000 Medikamente. A.V.I. Arzneimittel-Verlags GmbH.

Ashton, D., Hilton, M., Thomas, K. V. (2004): Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Sci. Total Environ.* **333**, 167-184.

AWEL (2005): Amt für Abfall, Wasser, Energie und Luft: Organische Spurenstoffe im Grundwasser des Limmattales – Ergebnisse der Untersuchungskampagne 2004.

Baran, W., Sochacka, J., Wardas, W. (2006): Toxicity and biodegradability of sulfonamides and products of their photocatalytic degradation in aqueous solutions. *Chemosphere* **65**, 1295–1299.

BLAC (2003): Arzneimittel in der Umwelt – Auswertung der Untersuchungsergebnisse. Bericht an die 61. Umweltministerkonferenz (UMK) am 19./20. November 2003 in Hamburg. <http://www.blac.de/servlet/is/2146/P-2c.pdf>.

Bernus, I., Hooper, W. D., Dickinson, R. G., Eadie, M. J. (1995): Metabolism of Carbamazepine and coadministered anticonvulsants during pregnancy. *Epilepsy Res.* **21**, 65-75.

Björnsson, L., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., Blackall, L.L. (2002): Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology* **148**(8), 2309-2318.

Bleisteiner, S., Kexel, S., Wedi, D. (2006): Membranbelebungsanlage Monheim - Erfahrungen über Betrieb, Leistungsfähigkeit und Auswirkung auf das Gewässer. *GWF Wasser Abwasser* **147** (7-8), 501-508.

Brain, R. A., Johnson, D. J., Richards, S. M., Sanderson, H., Sibley, P. K., Solomon, K. R. (2004): Effects of 25 pharmaceutical compounds to *lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environ. Tox. Chem.* **23**, 371-382.

Brauch, H.-J., Gabriel, S., Hüther-Windbiel, U., Leclerc, N., Mallat, E., Metzinger, M., Sacher, F., Stretz, A., Wenz, M. (2002): Vorkommen von Pharmaka und Hormonen in Grund-, Oberflächengewässern und Böden in Baden-Württemberg. Teilprojekt des Projekts-Nr. U33-00.01: Pharmaka und Hormone in der aquatischen Umwelt

- Brown, K. D., Kulis, J., Thomson, B., Chapman, T. H., Mawhinney, D. B. (2005): Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Sci. Total. Environ.* **366**, 772-783.
- Bundesärztekammer (2005): Stellungnahme zur Aufmerksamkeitsdefizit- / Hyperaktivitätsstörung (ADHS) – Kurzfassung. <http://www.bundesaerztekammer.de/downloads/adshkurz.pdf>.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Llompart, M. Garcia-Jares, C., Rodriguez, I., Gomez, M., Ternes, T. (2004): Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Wat. Res.* **38**, 2918-2926.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., Llompart, M., Garcia, C., Rodriguez, I., Gomez, M., Ternes, T. (2005): Behaviour of pharmaceuticals and personal care products in a sewage treatment plant of northwest Spain. *Water Sci. Technol.* **52**(8), 29-35.
- Celiz, M. D., Tso, J., Aga, D. S. (2009): Pharmaceutical metabolites in the environment: analytical challenges and ecological risks. *Environ. Toxicol. Chem.* **28**, 2473-2484.
- Clara, M. (2003): Das Verhalten ausgewählter organischer Spurenstoffe bei der biologischen Abwasserreinigung. Dissertation Technische Universität Wien.
- Clara, M., Strenn, B., Kreuzinger, N. (2004): Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Wat. Res.* **38**, 947-954.
- Daughton, C.G., Ternes, T.A. (1999): Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* **107**(Supplement 6), 907-938.
- Davenport, R.J., Curtis, T.P., Goodfellow, M., Stainsby, F.M., Bingley, M. (2000): Quantitative use of fluorescent in situ hybridization to examine relationships between mycolic acid-containing actinomycetes and foaming in activated sludge plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(3), 1158-1166.
- Desitin Arzneimittel GmbH Hamburg (2000): Fachinformation Liskantin ®.
- DEV (2000): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Physikalische, chemische, biologische und mikrobiologische Verfahren, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, und Beuth Verlag, Berlin.
- Drewes, J. E., Heberer, T., Rauch, T., Reddersen, K. (2003): Fate of pharmaceuticals during ground water recharge. *Ground Water Monitoring and Remediation* **23**, 64-72.
- Drillia, P., Dokianakis, S. N., Fountoulakis, M. S., Kornaros, M., Stamatelatos, K., Lyberatos, G. (2005a): On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: The example of the antibiotic Sulfamethoxazole. *J. Hazard Mater.* **122**, 259-265.
- Drillia, P., Stamatelatos, K., Lyberatos, G. (2005b): Fate and mobility of pharmaceuticals in solid matrices. *Chemosphere* **60**, 1034-1044.
- Düring, R.-A., Gull, S., Gäth, S. (2006): Pharmazeutische Reststoffe in der Umwelt. *Wasser und Abfall* **5**, 25-28.
- Erhart, R. (1997): In situ Analyse mikrobieller Biozönosen in Abwasserreinigungsanlagen. Dissertation, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München.
- Europäische Union (1996): Richtlinie 96/23/EG über Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Richtlinien 85/358/EWG und 86/496/EWG und der Entscheidungen 89/187/EWG und 91/664/EWG vom 29.04.1996.

- Fajardo, A., Martínez, J.L. (2008): Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Current Opinion in Microbiology* **11**(2), 161-167.
- Feldmann, D. F. (2005): Modellberechnungen zum Verhalten und Verbleib von Arzneimittelrückständen im Krankenhausabwasser und Beurteilungsmöglichkeiten ihres ökotoxikologischen Gefährdungspotentials. Dissertation der Technischen Universität Berlin.
- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D. (2006): Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* **76**(2), 122-159.
- Ferber, L. von, Schubert, I., Lehmkuhl, G., Spengler, A., Döpfner, M. (2001): Methylphenidat bei hyperkinetischen Störungen: Verordnungen in den 90er-Jahren. *Dt. Ärzteblatt* **98**, <http://www.aerzteblatt.de/v4/archiv/artikel.asp?id=26233>.
- Ferrari, B., Paxéus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A., Garric, J. (2003): Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: Study of Carbamazepine, Clofibric acid and Diclofenac. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **55**, 359-370.
- Gao, J., Pedersen, J. A. (2005): Adsorption of sulfonamide antimicrobial agents to clay minerals. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 9509-9516.
- Gich, F., Garcia-Gil, J., Overmann, J. (2001): Previously unknown and phylogenetically diverse members of the green nonsulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes. *Archives of Microbiology* **177**(1), 1-10.
- Gich, F., Schubert, K., Bruns, A., Hoffelner, H., Overmann, J. (2005): Specific Detection, Isolation, and Characterization of Selected, Previously Uncultured Members of the Freshwater Bacterioplankton Community. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(10), 5908-5919.
- Gieseke, S. (2009): ADHS: Bessere Versorgung. *Dt. Ärzteblatt* **8**, 337.
- Göbel, A., McArdell, C. S., Suter, M. J.-F., Giger, W. (2004): Trace determination of macrolide and sulfonamide antimicrobials, a human sulfonamide metabolite, and Trimethoprim in wastewater using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **76**, 4756-4764.
- Göbel, A., Thomsen, A., McArdell, C. S., Joss, A., Giger, W. (2005): Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides, and Trimethoprim in activated sludge treatment. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 3981-3989.
- Göbel, A., McArdell, C. S., Joss, A., Siegrist, H., Giger, W. (2007): Fate of sulfonamides, macrolides, and Trimethoprim in different wastewater treatment technologies. *Sci. Total Environ.* **372**, 361-371.
- Gómez, M. J., Martínez Bueno, M. J., Lacorte, S., Fernández-Alba, A. R., Agüera, A. (2007): Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere* **66**, 993-1002.
- Hanisch, B., Abbas, B., Kratz, K.-L. (2002): Ökotoxikologische Bewertung von Humanarzneimitteln in aquatischen Ökosystemen. Landesumweltamt Brandenburg, Studien- und Tagungsberichte Band 39.
- Hartig, C. (2000): Analytik, Vorkommen und Verhalten aromatischer Sulfonamide in der aquatischen Umwelt. Dissertation, Fakultät III Prozesswissenschaften, Technische Universität Berlin.
- Hazard Substances Data Bank: Toxikologische Datenbank der United States National Library of Medicine, frei zugänglich unter: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>.
- Heberer, T. (2002a): Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *J. Hydrol.* **266**, 175-189.
- Heberer, T. (2002b): Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters* **131**, 5-17.

- Heberer, T., Reddersen, K., Mechlinski, A. (2002): From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. *Wat. Sci. Technol.* **46**, 81-88.
- Heberer, T., Adam, M. (2004): Transport and attenuation of pharmaceutical residues during artificial groundwater replenishment. *Environ. Chem.* **1**, 22-25.
- Heberer, T., Mechlinski, A., Fanck, B., Knappe, A., Massmann, G., Pekdeger, A., Fritz, B. (2004): Field studies on the fate and transport of pharmaceutical residues in bank filtration. *Ground Water Monitoring and Remediation* **24**, 70-77.
- Hilton, M. J., Thomas, K. V. (2003): Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1015**, 129-141.
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.-L.: (1999): Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* **225**, 109-118.
- Holsten Pharma GmbH: [www.holstenpharma.de/fachkreise/Primidon.pdf](http://www.holstenpharma.de/fachkreise/Primidon.pdf).
- Hummel, D., Löffler, D., Fink, G., Ternes, T. A. (2006): Simultaneous determination of psychoactive drugs and their metabolites in aqueous matrices by liquid chromatography mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 7321-7328.
- Ingerslev, F., Halling-Sørensen, B. (2000): Biodegradability properties of sulfonamides in activated sludge. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**(10), 2467-2473.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., Parrella, A. (2005): Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Sci. Total Environ.* **346**, 87-98.
- Jekel, M., Grünheid, St. (2007): Ist die Uferfiltration eine effektive Barriere gegen organische Substanzen und Arzneimittelrückstände? *GWF Wasser – Abwasser* **148**, 698-703.
- Joss, A., Keller, E., Alder, A. C., Göbel, A., Mc Ardell, C. S., Ternes, T., Siegrist, H. (2005): Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Wat. Res.* **39**, 3139-3152.
- Kahle, M., Buerge, I. J., Muller, M. D., Poiger, T. (2009): Hydrophilic anthropogenic markers for quantification of wastewater contamination in ground- and surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.* **28**, 2528-2536.
- Karthikeyan, K. G., Meyer, M. T. (2006): Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Sci. Total Environ.* **361**, 196-207.
- Knacker, T. (2003): Preliminary environmental risk assessment (ERA) for pharmaceuticals and personal care products (PPCPs). Vortrag Envirpharm Lyon 14.-16. April 2003, ECT Ökotoxikologie GmbH, 65439 Flörsheim/Main.
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., Buxton, H. T. (2002): Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 1202-1211.
- Kommentar zum Europäischen Arzneibuch (2005): Grundwerk mit Ergänzungslieferung, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 22. Lieferung.
- Kortmann, K. (2008): „Zappelphilipp“ – oft bloss falsch erzogen. *Bild der Wissenschaft* **1**, 73-76.
- Kosjek, T., Heath, E., Petrović, M., Barceló, D. (2007): Mass spectrometry for identifying pharmaceutical biotransformation products in the environment. *Trends Anal. Chem.* **26**, 1076-1085.

- Kreuzinger, N., Clara, M., Strenn, B., Kroiss, H. (2004): Relevance of the sludge retention time (SRT) as design criteria for wastewater treatment plants for the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals from wastewater. *Wat. Sci. Technol.* **50**(5), 149-156.
- Kümmerer, K. (2008): Pharmaceuticals in the environment. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-London.
- Kümmerer, K., Alexy, R., Hüttig, J., Schöll, A. (2004): Standardized tests fail to assess the effects of antibiotics on environmental bacteria. *Wat. Res.* **38**(8), 2111-2116.
- Lajeunesse, A., Gagnon, C., Sauve, S. (2008): Determination of basic antidepressants and their N-desmethyl metabolites in raw sewage and waste water using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **80**, 5325-5333.
- Lam, M. W., Mabury, S. A. (2005): Photodegradation of the pharmaceutical atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters. *Aquat. Sci.* **67**, 177-188.
- Lam, M. W., Young, C. J., Brain, R. A., Johnson, D. J., Hanson, M. A., Wilson, C. J., Richards, S. M., Solomon, K. R., Mabury, S. A. (2004): Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study. *Environ. Toxicol. Chem.* **23**, 1431-1440.
- Lane, D.J. (1991): 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (eds), pp. 115-175. John Wiley and Sons, New York.
- LANUV-Fachbericht 2 (2007): Eintrag von Arzneimitteln und deren Verhalten und Verbleib in der Umwelt – Literaturstudie. Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen. ISSN 1864-3930, 283 S.
- LAWA (2005): Projektbericht zum LAWA-Projekt Nr. O 10.03 "Entwicklung von Umweltqualitätsnormen zum Schutz aquatischer Biota in Oberflächengewässern" (unveröffentlicht).
- Lemmer, H., Kroppenstedt, R.M. (1984): Chemotaxonomy and physiology of some actinomycetes isolated from scumming activated sludge. *System. Appl. Microbiol.* **5**, 124-135.
- LfU (2008): Verhalten prioritärer organischer Stoffe der Wasserrahmenrichtlinie in Kläranlagen und beim Eintrag in oberirdische Gewässer. Schlussbericht des F+E-Vorhabens, Berichterstattung: M. Letzel und M. Gierig.
- LfU (2009): Arzneimittelwirkstoffe und ausgewählte Metaboliten – Untersuchungen in bayerischen Gewässern 2004-2008. Umwelt Spezial, Berichterstattung Sengl, M., Schüssler, W.
- LfW (2004a): Arzneimittel in der Umwelt 2000-2002. Schlussbericht des F+E-Vorhabens, Berichterstattung Schüssler, W., Sengl, M.; Materialien Nr. 114.  
[http://www.bestellen.bayern.de/application/stmuqv\\_app000000?SID=437197153&ACTIONxSETVAL\(artdtl.htm,AARTxNR:lfw\\_was\\_00204,USERxARTIKEL:artlist1.htm\)=X](http://www.bestellen.bayern.de/application/stmuqv_app000000?SID=437197153&ACTIONxSETVAL(artdtl.htm,AARTxNR:lfw_was_00204,USERxARTIKEL:artlist1.htm)=X)
- LfW (2004b). Ökotoxikologische Auswirkungen von Arzneimitteln. Langzeitwirkungen bei Fischen. Schlussbericht des F+E-Vorhabens 2001-2003, Berichterstattung Schwaiger, J., Mallow, W., Ferling, H.
- Lienert, J., Güdel, K., Escher, B. I. (2007): Screening method for ecotoxicological hazard assessment of 42 pharmaceuticals considering human metabolism and excretory routes. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 4471-4478.
- Lindberg, R. H., Wennberg, P., Johansson, M. I., Tysklind, M., Andersson, B. A. V. (2005): Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 3421-3429.

- Löffler, D., Rombke, J., Meller, M., Ternes, T. A.: (2005): Environmental fate of pharmaceuticals in water/sediment systems. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 5209-5218.
- Loy, A., Horn, M., Wagner, M. (2003): probeBase: An online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Nucl. Acids Res.* **31**(1), 514-516, [www.microbial-ecology.net/probebase/](http://www.microbial-ecology.net/probebase/).
- LUA BRB Landesumweltamt Brandenburg (2002): Ökotoxikologische Bewertung von Humanarzneimitteln in aquatischen Ökosystemen – Studien und Tagungsberichte, Band 39. Potsdam, Frankfurt.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatidis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K.H. (2004): ARB: A software environment for sequence data. *Nucl. Acids Res.* **32**, 1363-1371.
- Manz, W., Wagner, M., Amann, R., Schleifer, K.H. (1994): In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. *Wat. Res.* **28**(8), 1715-1723.
- Massmann, G., Heberer, T., Grutzmacher, G., Dunnbier, U., Knappe, A., Meyer, H., Mechlinski, A., Pekdeger, A. (2007): Drinking-water production in urban environments bank filtration in Berlin. *Grundwasser* **12**, 232-245.
- Mersmann, P. (2003): Transport- und Sorptionsverhalten der Arzneimittelwirkstoffe Carbamazepin, Clofibrinsäure, Diclofenac, Ibuprofen und Propyphenazon in der wassergesättigten und –ungesättigten Zone. Dissertation Techn. Universität Berlin.
- Metzger, J. W., Kuch, B., Schneider, C., Krampe, J., Schrader, C. (2004): Eliminierungsverfahren von Pharmaka auf Kläranlagen und Effizienz weitergehender Behandlungsstufen. Aus Tagungsband: Pharmazeutische Reststoffe in Abwässern, Bremen.
- Miao, X.-S., Metcalfe, C. D. (2003): Determination of Carbamazepine and its metabolites in aqueous samples using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **75**, 3731-3738.
- Möhle, E., Kempter, C., Kern, A., Metzger, J. W. (1999): Untersuchungen zum Abbau von Pharmaka in kommunalen Kläranlagen mit HPLC-Elektrosprays-Massenspektrometrie. *Acta hydrochim. hydrobiol.* **27**, 430-436.
- Miao, X.-S., Yang, J.-J., Metcalfe, C. D. (2005): Carbamazepine and its metabolites in wastewater and in biosolids in a municipal wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 7469-7475.
- Mückter, H., Höller, C., Ternes, T., Meiser, H. (2004): Abschlussbericht zum Forschungsprojekt „Zweite Untersuchung ausgewählter Trinkwassergewinnungsanlagen auf Antibiotika“.
- Müller, E. (2006): Bacteria and extracellular polymeric substances in activated sludge and scum formation. Dissertation, Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft, Technische Universität München. <http://mediatum.ub.tum.de>.
- Müller, E., Schade, M., Lemmer, H. (2007): Filamentous scum bacteria in activated sludge plants: detection and identification quality by conventional sludge microscopy vs. fluorescence in situ hybridization. *Water Environ. Res.* **79**(11).
- Muyzer, G., Smalla, K. (1998): Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**(1), 127-141.



- Muyzer, G., Hottenträger, A., Teske, A., Waver, C. (1995): Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA – a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*. Akkerman, A.D.L., van Elsas, J.D., de Bruijn, F.J. (eds), pp. 1-22. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Novartis Pharma (2002): Fachinformation Ritalin.  
[http://www.tokol.de/component/option,com\\_docman/task,doc\\_view/gid,10/](http://www.tokol.de/component/option,com_docman/task,doc_view/gid,10/)
- Oehlmann, J., Hannich, C. B., Magdeburg, A., Nöthe, T., Stalter, D., Wagner, M. (2006): Erfassung organischer Spurenstoffe im Abwasser durch biologische Wirktests und ökotoxikologische Bewertung der Effekte. Zusammenfassungen des DWA-Seminars Abwasserbehandlung, 18.Oktober 2006 in Koblenz.
- Oetken, M., Nentwig, G., Löffler, D., Ternes, T., Oehlmann, J. (2005): Effects of Pharmaceuticals on Aquatic Invertebrates. Part I. The Antiepileptic Drug Carbamazepine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **49**, 353–361.
- Oppel, J., Broll, G., Löffler, D., Meller, M., Römbke, J., Ternes, Th. (2004): Leaching behaviour of pharmaceuticals in soil-testing-systems: a part of an environmental risk assessment for groundwater protection. *Sci. Total Environ.* **328**, 265-273.
- Pei, R., Kim, S.-C., Carlson, K.H., Pruden, A. (2006): Effect of River Landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Wat. Res.* **40**, 2427 – 2435.
- Pérez, S., Barceló, D. (2008): First evidence for occurrence of hydroxylated human metabolites of diclofenac and aceclofenac in wastewater using QqLIT-MS and QqTOF-MS. *Anal. Chem.* **80**, 8135-8145.
- Perez, S., Eichhorn, P., Aga, D. S. (2005): Evaluating the biodegradability of Sulfamethazine, Sulfamethoxazole, Sulfathiazole, and Trimethoprim at different stages of sewage treatment. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**, 1361-1367.
- Perreten, V., Boerlin, P. (2003): A new sulfonamide resistance gene (sul3) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**(3), 1169-1172.
- Ranjard, L., Poly, F., Combrisson, J., Richaume, A., Nazaret, S. (1998): A single procedure to recover DNA from the surface or inside aggregates and in various size fractions of soil suitable for PCR-based assays of bacterial communities. *European J. Soil Biology* **34**(2), 89-97.
- Reasoner, D.J., Geldreich, E.E. (1985): A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**(1), 1-7.
- Reddersen, K. (2004): Das Verhalten von Arzneimittelrückständen im Wasserkreislauf Berlins. Dissertation der Technischen Universität Berlin.
- Reutelshöfer, T. (2009): Nachweis von Sulfamethoxazol-resistenten Bakterien und Sulfonamid-Resistenzgenen in verschiedenen Kläranlagensystemen. Diplomarbeit, Studiengang Umweltsicherung, Fachhochschule Weihenstephan, Abteilung Triesdorf / Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft, Technische Universität München.
- RTECS Datenbank (2001): National Institute for Occupational Safety and Health. Hrsg.: Canadian Centre for Occupational Health and Safety, CD-ROM Ausgabe 2001-2002.
- Sacher, F., Lochow, E., Bethmann, D., Brauch, H.-J. (1998): Vorkommen von Arzneimittelwirkstoffen in Oberflächenwässern. *Vom Wasser* **90**, 233-243

- Sacher, F., Lange, F. T., Brauche, H.-J., Blankenhorn, I. (2001): Pharmaceuticals in groundwaters. Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *J. Chromatogr. A* **938**, 199-210.
- Sacher, F., Gabriel, S., Metzinger, M., Stretz, A., Wenz, M., Lange, F. T., Brauch, H.-J., Blankenhorn, I. (2002): Arzneimittelwirkstoffe im Grundwasser – Ergebnisse eines Monitoring-Programms in Baden Württemberg. *Vom Wasser* **99**, 183-196.
- Schmidt, C. K., Brauch, H. J. (2006): Die Entfernbarkeit von pharmazeutischen Wirkstoffen und Röntgenkontrastmitteln bei der Trinkwasseraufbereitung. In: Arzneimittelrückstände im aquatischen Milieu, 29. Abwassertechnisches Seminar, pp. 71-91. Berichte aus Siedlungswasserwirtschaft TUM, Nr. 189, TU München.
- Schmidt, C. K., Lange, F. T., Brauch, H.-J., Kühn, W. (2003): Experiences with riverbank filtration and infiltration in Germany. International Symposium on Artificial Recharge of Groundwater, Korea.
- Schmitt, H., Stoob, K., Hamscher, G., Smit, E., Seinen, W. (2006): Tetracyclines and tetracycline resistance in agricultural soils: microcosm and field studies. *Microb. Ecol.* **51**(3), 267-276.
- Schneider, C. (2004): Synthetische organische Spurenstoffe in der aquatischen Umwelt und ihr Verhalten im Klärprozess. Dissertation Universität Stuttgart.
- Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., Püttmann, W. (2007): Humanpharmakawirkstoffe in der Umwelt: Einträge, Vorkommen und der Versuch einer Bestandsaufnahme. *UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox.* **19**, 168-179.
- Skold, O. (2000): Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates* **3**(3), 155-160.
- Snaird, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1997): Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(7), 2884-2896.
- Soddell, J.A., Seviour, R.J., Blackall, L.L., Hugenholtz, P. (1998): New foam-forming nocardioforms found in activated sludge. *Water Sci. Technol.* **37** (4-5)(4-5), 495-502.
- Stan, H.-J., Linkerhägner, M. (1992): Identifizierung von 2-(4-Chlorphenoxy)-2-methylpropionsäure im Grundwasser mittels Kapillar-Gaschromatographie mit Atomemissionsdetektion und Massenspektrometrie. *Vom Wasser* **79**, 75-88.
- Stein, K., Ramil, M., Rink, G., Ternes, T. (2007): Sorption von Psychopharmaka und Antibiotika im Wasser-Sediment-System. Poster auf der Tagung der Wasserchemischen Gesellschaft, 07.-09.05.2007, Passau.
- Strenn, B., Clara, M., Gans, O., Kreuzinger, N. (2004): Carbamazepine, Diclofenac, Ibuprofen and Bezafibrate – Investigations on the Behaviour of Selected Pharmaceuticals during Wastewater Treatment. *Wat. Sci. Technol.* **50**, 269-276.
- Stülten, D., Zühlke, S., Lamshöft, M., Spiteller, M. (2008): Occurrence of diclofenac and selected metabolites in sewage effluents. *Sci. Total Environ.* **405**, 310-316
- Stumpf, M., Ternes, T.A., Heberer, K., Baumann, W. (1998): Isolierung von Ibuprofen-Metaboliten und deren Bedeutung als Kontaminanten der aquatischen Umwelt. *Vom Wasser* **91**, 291-303.
- Ternes, T. A. (1998): Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Wat. Res.* **32**, 3245-3260.

- Ternes, T. A., Stüber, J., Herrmann, N., McDowell, D., Ried, A., Kampmann, M., Teiser, B. (2003): Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? *Wat. Res.* **37**, 1976-1982.
- Ternes, T. A., Herrmann, N., Bonerz, M., Knacker, T., Siegrist, H., Joss, A. (2004): A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient ( $K_d$ ) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Wat Res.* **38**, 4075-4084.
- Ternes, T. A., Römbke, J. (2005): Behaviour of selected human and veterinary pharmaceuticals in aquatic compartments and soil. Umweltbundesamt (Hrsg.), Texte 05/05, Förderkennzeichen 299 67 401/01, Berlin.
- Ternes, T., Joss, A. (2007): Human pharmaceuticals, hormones and fragrances: the challenge of micropollutants in urban water management. IWA Publishing, London.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996): Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**(2), 407-438.
- Vanderford, B.J., Snyder, S.A. (2006): Analysis of pharmaceuticals in water by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 7312-7320.
- Vierheilig, J. (2009): Phylogenetische und physiologische Charakterisierung von Sulfamethoxazol abbauenden Mikroorganismen im Abwasser. Diplomarbeit, Studiengang Biologie, Lehrstuhl für Biotechnologie, Bayerische Julius Maximilians-Universität Würzburg / Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft, Technische Universität München.
- Vree, T. B., van der Ven, A. J. A. M., Koopmans, P. P., van Ewijk-Beneken Kolmer, E. W. J., Verwey-van Wissen, C. P. W. G. M. (1995): Pharmacokinetics of Sulfamethoxazol with its hydroxy metabolites and N4-Acetyl-, N1-Glucuronide conjugates in healthy human volunteers. *Clin. Drug Invest.* **9**, 43-53.
- Weigel, S., Kallenborn, R., Hühnerfuss, H. (2004): Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1023**, 183-195.
- Wiegel, S., Aulinger, A., Brockmeyer, R., Harms, H., Löffler, J., Reincke, H., Schmidt, R., Stachel, B., von Tümpling, W., Wanke, A. (2004): Pharmaceutical in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere* **57**, 107-126.
- Witte, W. (2004): International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. *Infection, Genetics and Evolution* **4**(3), 187-191.
- Yang, S., Carlson, K. (2003): Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. *Wat. Res.* **37**, 4645-4656.
- Zuehlke, S., Duennbier, U., Heberer, T. (2004): Determination of polar drug residues in sewage and surface water applying liquid chromatography – Tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **76**, 6548-6554.

### **Aus dem Projekt hervorgegangene Diplomarbeiten und Bachelorarbeit**

(als pdf verfügbar bei Dr. Hilde Lemmer, Landesamt für Umwelt):

Arbeiter, A. (2008): Der Effekt des Antibiotikums Sulfamethoxazol auf die Abwasserbiozönose. Diplomarbeit, Studiengang Biologie, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt / Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft, Technische Universität München, pp. 1-95.

Reutelshöfer, T. (2009): Nachweis von Sulfamethoxazol-resistenten Bakterien und Sulfonamid-Resistenzgenen in verschiedenen Kläranlagensystemen. Diplomarbeit, Studiengang Umweltsicherung, Fachhochschule Weihenstephan, Abteilung Triesdorf / Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft, Technische Universität München, pp. 1-72.

Schmied, C. (2010): Nachweis von Sulfonamidresistenzgenen mit konventioneller und real-time PCR in Reinkulturen und Umweltproben. Bachelorarbeit, Studiengang Chemie, Fachhochschule Aalen / Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft, Technische Universität München, pp. 1-92.

Vierheilig, J. (2009): Phylogenetische und physiologische Charakterisierung von Sulfamethoxazol abbauenden Mikroorganismen im Abwasser. Diplomarbeit, Studiengang Biologie, Lehrstuhl für Biotechnologie, Bayerische Julius Maximilians-Universität Würzburg / Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft, Technische Universität München, pp. 1-108.

## 6 Anhang

Beprobung 22.-24.4.09		Stoffkonzentrationen in ng/l														
Entnahmestelle	Sulfamethoxazol	Acetyl-Sulfamethoxazol	Primidon	PEMA	Carbamazepin	Carbamazepin-Epoxid	10, 11-Dihydro-10, 11-dihydroxy-carbamazepin	Amidotrizoensäure	Ritalinsäure	Benzotriazol	Tolytriazole	Desphenylchloridazon	Methyldesphenylchloridazon	TCEP	TOPP	TDCPP
A	72	<2	11	7	26	5	52	260	3	150	140	72	<50	<5	30	5
B	60	<2	10	5	38	3	47	240	4	250	190	100	<50	<5	24	7
C	53	<2	14	8	60	8	12	300	3	250	150	120	<50	<5	35	7
D	82	<2	15	9	75	3	31	320	5	390	270	140	<50	<5	69	10
E	69	<2	12	7	60	7	55	300	4	400	380	160	<50	<5	58	14
F	<2	<2	9	5	33	<2	<2	<50	<2	<50	<50	300	220	<5	15	<5
Main	38	9	6	5	29	<2	46	280	4	240	250	160	50	12	54	23
Rohwasser	55	<2	12	8	58	6	34	160	4	350	280	130	<50	<5	52	10
G	44	<2	14	6	41	9	51	210	3	60	140	120	<50	<5	<5	<5
H	29	<2	12	7	40	10	28	200	3	80	160	100	<50	<5	6	<5
I	29	<2	15	9	60	11	47	280	3	80	120	140	<50	<5	<5	<5
Rohwasser	32	<2	13	6	39	11	32	180	3	60	150	120	<50	<5	<5	<5
Main	61	10	9	6	45	4	61	230	5	450	380	120	<50	8	63	16
J	2	<2	14	9	60	<2	<2	<50	2	<50	70	480	250	<5	37	<5
K	<2	<2	<2	<2	<25	<2	<2	<50	<2	<50	<50	1400	1500	<5	7	<5
L	<2	<2	<2	<2	<25	<2	<2	<50	<2	<50	<50	120	<50	<5	<5	<5
Main	34	10	8	5	38	3	52	230	5	450	350	140	<50	13	64	23
Main	14	<2	6	2	15	10	2	120	<2	60	50	72	<50	<5	8	<5
N	38	<2	16	10	75	14	48	410	3	150	240	140	<50	<5	20	10
Main	39	10	8	5	40	4	60	260	5	360	370	130	<50	11	62	22
O	3	<2	6	4	27	2	<2	<50	<2	70	120	56	<50	<5	27	<5
P	11	<2	14	10	75	4	<2	<50	3	170	150	100	<50	<5	56	11
Q	35	<2	19	15	100	10	6	290	3	280	300	140	<50	<5	85	14
R	5	<2	10	4	10	3	<2	50	<2	70	<50	150	<50	<5	8	<5
S	26	<2	19	9	70	19	7	380	3	120	120	680	240	<5	26	<5
T	<2	<2	<2	<2	<25	<2	<2	<50	<2	<50	<50	<50	<50	5	9	<5
U	13	<2	10	8	50	5	2	110	2	130	100	100	<50	n.b.	n.b.	n.b.
V	11	<2	9	4	23	7	2	130	2	60	<50	260	70	<5	8	<5
Regnitz vor KA	72	10	13	9	94	6	100	430	10	840	770	160	<50	16	129	33
Regnitz nach KA	110	10	18	12	105	8	140	700	14	1000	1000	170	<50	21	160	38
Z	22	<2	16	11	52	10	5	200	2	200	80	190	<50	<5	20	<5
AA	14	<2	14	10	65	6	11	260	2	190	80	170	<50	<5	33	6
AB	60	<2	40	31	110	7	35	650	5	830	250	220	60	<5	62	8
Rezat nach KA	90	50	28	22	120	9	150	1300	13	620	950	250	80	14	143	39
Rohwasser	19	<2	11	8	38	4	5	130	2	170	60	100	<50	<5	20	<5

Anhang 1: Polare Spurenstoffe in Oberflächengewässern, Uferfiltrat beeinflussten Brunnen und Rohwässern – Beprobung April 2009 (anonymisiert). Brunnendetails siehe Tab. 7.

Beprobung 15.-17.9.09		Stoffkonzentrationen in ng/l															
Entnahmestelle	Sulfamethoxazol	Acetyl-Sulfamethoxazol	Primidon	PEMA	Carbamazepin	Carbamazepin-Epoxid	10,11-Dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepin	Amidotrizoessäure	Ritalinsäure	Benzotriazol	Tolytriazole	Desphenylchloridazon	Methyldesphenylchloridazon	Acesulfam	TCEP	TCPP	TDCPP
A	27	<2	11	7	45	6	20	170	2	240	180	120	<50	1400	<5	43	8
B	40	<2	15	10	75	9	60	310	3	360	300	200	<50	2200	<5	58	16
C	15	<2	9	5	30	5	2	100	<2	110	50	120	<50	950	<5	19	<5
D	37	<2	16	11	87	9	40	300	4	400	260	190	<50	2300	<5	87	19
E	46	<2	18	12	97	10	100	360	4	400	390	180	<50	2600	<5	70	25
F	<2	<2	5	3	20	<2	<2	<50	<2	<50	<50	350	210	500	<5	12	<5
Main	65	7	22	16	110	13	200	570	6	630	600	220	50	3500	26	220	35
Rohwasser	33	<2	15	10	75	9	40	260	3	360	280	170	<50	2200	<5	67	15
G	11	<2	12	4	39	21	50	110	<2	50	<50	180	<50	950	<5	<5	<5
H	9	<2	11	5	38	13	35	80	<2	70	<50	160	<50	950	<5	5	<5
I	9	<2	12	6	46	10	50	140	<2	60	<50	180	<50	1000	<5	5	<5
Rohwasser	10	<2	12	5	40	15	40	110	<2	50	<50	170	<50	950	<5	<5	<5
Main	51	6	18	14	82	11	170	400	5	480	470	180	<50	3100	23	156	23
J	<2	<2	12	8	56	<2	<2	<50	<2	<50	70	650	260	1500	<5	46	<5
K	<2	<2	<2	<2	8	<2	<2	<50	<2	<50	<50	1600	1400	240	<5	9	<5
L	<2	<2	4	3	4	<2	<2	<50	<2	<50	<50	120	<50	300	<5	<5	<5
M	8	<2	2	2	22	10	<2	90	<2	50	<50	100	<50	400	<5	5	<5
N	34	<2	16	11	72	10	53	370	4	150	170	210	<50	2300	<5	33	8
Main	70	9	20	16	110	13	210	530	6	530	550	210	<50	3300	25	186	35
O	4	<2	8	6	35	<2	19	<50	<2	70	<50	70	<50	850	<5	33	<5
P	10	<2	16	12	82	4	<2	120	2	180	110	130	<50	2200	<5	79	11
Q	18	<2	16	12	110	8	7	330	<2	160	160	110	<50	2000	<5	76	12
R	5	<2	6	4	26	4	<2	50	<2	<50	<50	130	<50	500	<5	14	<5
S	2	<2	5	3	18	2	<2	<50	<2	50	<50	130	<50	460	<5	11	<5
T	23	<2	16	8	60	12	19	250	2	95	50	480	140	1900	<5	28	<5
U	13	<2	11	4	33	17	3	300	<2	50	<50	220	<50	1100	<5	7	<5
V	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<50	<2	<50	<50	50	<50	50	<5	7	<5
Rohwasser	9	<2	9	7	47	4	4	55	<2	110	60	85	<50	1300	<5	44	6
Rohwasser	6	<2	7	3	25	5	4	110	<2	<50	<50	330	90	750	<5	10	<5
Regnitz vor KA	75	12	21	16	120	12	270	310	6	640	700	190	<50	3600	38	194	42
Regnitz nach KA	100	24	24	20	160	13	290	490	8	1000	1000	180	<50	4700	53	250	57
W	11	<2	9	7	20	2	14	140	<2	80	<50	360	60	570	<5	20	<5
X	14	<2	13	10	35	3	16	210	<2	130	50	300	<50	1000	<5	24	<5
Y	30	<2	25	21	90	5	25	460	3	300	110	320	<50	2100	<5	58	7
Z	13	<2	14	10	40	5	8	180	<2	160	<50	200	<50	900	<5	20	<5
AA	7	<2	10	8	43	3	11	260	<2	140	<50	200	<50	900	<5	26	6
AB	28	<2	22	17	71	5	30	350	3	350	150	230	60	1700	<5	62	7
AC	40	<2	21	17	82	8	65	540	3	350	210	190	<50	1900	<5	69	11
Rezat vor KA	150	10	74	65	320	33	600	3800	19	1400	1800	320	70	8200	42	560	58
Rezat nach KA	190	14	87	76	400	40	740	4800	23	1600	2000	260	60	10000	37	448	51
Rohwasser I - III	18	<2	13	10	35	3	23	230	<2	190	60	200	<50	1000			

Anhang 2: Polare Spurenstoffe in Oberflächengewässern, Uferfiltrat beeinflussten Brunnen und Rohwässern – Beprobung September 2009 (anonymisiert). Brunnendetails siehe Tab. 7.

---

### Anhang 3: Weitere untersuchte polare Spurenstoffe („Nicht-Arzneimittelwirkstoffe“):

Benzotriazol (1H-Benzotriazol) und Tolyltriazole (Summe von 4-Methyl-1H-Benzotriazol und 5-Methyl-1H-Benzotriazol) werden als Korrosionsinhibitoren hauptsächlich in Maschinengeschirrspülmitteln (ca. 70 t/a), Frostschutzmitteln und Flugzeugenteisungsmitteln eingesetzt. Aufgrund der geringen Sorptionsfähigkeit und der schlechten biologischen Abbaubarkeit ist die Eliminierung in Kläranlagen unvollständig.

Acesulfam ist ein synthetischer Süßstoff, der beispielsweise für kalorienarme Getränke verwendet wird. Acesulfam wird vom Körper wieder vollständig und unverändert ausgeschieden. Der Süßstoff wird in Kläranlagen nicht eliminiert und ist auch in Oberflächengewässern relativ stabil. Somit erfüllt er die Kriterien eines idealen Markers für häusliche Abwässer.

Phosphorsäuretriester werden als Flammschutzmittel und Weichmacher z. B. in Farben, Tapeeten, Polstermöbeln, Teppichböden, Textilien und elektronischen Geräten eingesetzt. Aufgrund ihrer hohen Produktionsmengen (>5000 t/a in der EU) wurden die Substanzen TCPP (Tris(2-chloro-1-propyl)-phosphat) und TDCPP (Tris(dichlorpropyl)-phosphat) zur Untersuchung ausgewählt. TCEP (Tris(2-chlorethyl)-phosphat) wurde als mögliche „Altlast“ ebenfalls quantifiziert. Dieser Stoff wird laut Angaben der Industrie seit mehreren Jahren nicht mehr verwendet. Ein Eintrag von TCPP und TDCPP in das kommunale Abwasser wird über Waschlaugen vermutet.

Desphenylchloridazon und Methyl-Desphenylchloridazon sind ein Abbauprodukt bzw. Transformationsprodukt des Herbizids Chloridazon, das seit den 60er Jahren hauptsächlich im Rübenanbau eingesetzt wird. Nachweise von Desphenylchloridazon und Methyl-Desphenylchloridazon im Grund- und Trinkwasser, teilweise in Konzentrationen bis mehrere µg/l, konzentrieren sich auf bestehende bzw. ehemalige Rübenanbaugelände. Die Metaboliten zeigen keine pestizide Wirkung.

Anhang 4: Daten zur aquatischen Toxizität und Vorschlag zur Ableitung von PNEC-Werten (Dr. Stockerl, LfU Ref. 76; Stand Januar 2010)

Stoff	CAS-Nr.	Fisch				Wirbellose				Algen u. Wasserpflanzen				Vorschlag PNEC (µg/l) (Sicherheitsfaktor)		PNEC, Lit.			
		Spezies	Endpunkt	Parameter	Wert (mg/l, ggf. Median)	Quelle	Spezies	Endpunkt	Parameter	Wert (mg/l, ggf. Median)	Quelle	Spezies	Endpunkt	Parameter	Wert (mg/l, ggf. Median)	Quelle	µg/l	Quelle	
Sulfamethoxazol	722-46-6	<i>Pimephales promelas</i>	Mortalität	LC50, 96 h	890	ETOX	<i>Chironomus dubius</i>	Immobilisation	EC50, 48 h	15.5	HSDB	<i>Synechococcus leopoldensis</i> (Blaualge)	Wachstum	EC50, 96 h	0.03	HSDB	3.3	Knaacker (2003)	
M-Acetyl-Sulfamethoxazol	21312-10-7						<i>Daphnia magna</i>	Immobilisation	NOEC, 48 h	> 100	OSBL								
Aminobenzocisuren	117-98-4						<i>Daphnia magna</i>	Immobilisation	EC50, 48 h	91	HPVS	<i>Scenedesmus subopacatus</i>	Bionasse	EC50, 72 h	102	HPVS			
Benzoflazinol	95-14-7	<i>Pimephales promelas</i>	Mortalität	LC50, 77	130	ETOX	<i>Daphnia magna</i>	Immobilisation	EC50, 48 h	91	HPVS	<i>Scenedesmus subopacatus</i>	Bionasse	EC10, 72 h	201	HPVS	40	(SF 100, oh LCS0 Fisch niedriger als EC50 Algal Daphnie)	Staber (1987)
		<i>Salmo gairdneri</i>	Mortalität	LC50, 96 h	39	HPVS	<i>Daphnia magna</i>	Immobilisation	EC50, 48 h	141.6	OSBL	<i>Scenedesmus subopacatus</i>	Wachstum	EC50, 72 h	201	HPVS	36		
		<i>Pimephales promelas</i>	Mortalität	LC50, 96 h	25	HPVS	<i>Daphnia magna</i>	Reproduktion	NOEC, 21 d	25.9	HPVS	"Other aquatic plant"	Bionasse	NOEC, 96 h	4.1	HPVS			
		<i>Bretylano rerio</i>	Mortalität	LC50, 96 h	> 100	HPVS	<i>Tetrahymena parviteris</i>	Histologie	EC50, 60 h	310	ECOTOX								
		<i>Bretylano rerio</i>	Mortalität	LC50, 96 h	65	HPVS	<i>Daphnia magna</i>	Reproduktion	NOEC, 21 d	18.4	HPVS	<i>Scenedesmus subopacatus</i>	Bionasse	EC50, 72 h	32	HPVS	7.5		
		<i>Pimephales promelas</i>	Mortalität	LC50, 96 h	25.5	HPVS	<i>Daphnia magna</i>	Reproduktion	EC50, 21 d	18.4 - 37.6	HPVS	<i>Scenedesmus subopacatus</i>	Wachstum	NOEC, 72 h	7.5	HPVS	66	Stadskyj (2002)	
		<i>Salmo gairdneri</i>	Mortalität	LC50, 96 h	21.4	HPVS	<i>Daphnia magna</i>	Immobilisation	EC50, 21 d	> 37.6	HPVS								
Prinidon (Desoxyphenbutamid)	125-33-7																		
PEMA (Phenylthiofenamid)	7208-78-0																		
Carbamazepin	298-46-4	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Zydotox	EC50, 72 h	4.5	GSBL	<i>Daphnia magna</i>	Immobilisation	EC50, 48 h	97.6	OSBL	<i>Chironis vulgaris</i>	Wachstum	EC50, 24 h	36.9	OSBL	0.5	LAWA (2005)	
		<i>Bretylano rerio</i>	Mortalität	LC50, 96 h	43	ILCLD	<i>Daphnia magna</i>	Immobilisation	EC50, 24 h	92	ILCLD						2.5	BLAC (2003)	
																	17	LUA, EBB (2002)	
Carbamazepin-Epoxid	36507-30-9																		
10,11-Dihydro-10,11-dihydro-carbamazepin	36078-97-1																		
Retinolaur (n-Phenyl-2-phenylacetat)	289-59-9																		
Desphenylchloridazon	6329-19-1																		
Methylphenylchloridazon	17254-80-7																		
Acetamin (Acetamin H)	53665-90-6 (55589-62-3)	<i>Zebrafisch</i>	Mortalität	LC50, 48 h	2500	HSDB	<i>Daphnia magna</i>	Immobilisation	EC50, 24 h	186	EIOX	<i>Selenastrium capricornutum</i>	Wachstum	EC50, 96 h	117	ILCLD			
		<i>Oleorite</i>	Mortalität	LC50, 96 h	> 1000	GSBL	<i>Daphnia magna</i>	Immobilisation	EC50, 24 h	451	EIOX	<i>Selenastrium capricornutum</i>	Wachstum	NOEC, 96 h	5	ILCLD			
		<i>Oleorite</i>	Mortalität	LC50, 48 h	200	HSDB	<i>Daphnia magna</i>	Mortalität	EC50, 24 h	1.9	ILCLD	<i>Scenedesmus subopacatus</i>	Bionasse	EC50, 72 h	1.1	ILCLD	1.1	(SF 1000)	
		<i>Regenbogenforelle</i>	Mortalität	LC50, 96 h	249	HSDB	<i>Daphnia magna</i>	Immobilisation	NOEC, 14 d	4.9 (7)	ILCLD	<i>Scenedesmus subopacatus</i>	Wachstum	EC50, 72 h	3.8	ILCLD			
		<i>Oryzias latipes</i>	Mortalität	LC50, 48 h	68 (7)	ECOTOX	<i>Daphnia magna</i>	Immobilisation	EC50, 24 h	65	EIOX	<i>Selenastrium capricornutum</i>	Wachstum	EC50, 96 h	57	EIOX			
		<i>Oryzias latipes</i>	Mortalität	LC50, 96 h	6.3	ILCLD	<i>Daphnia magna</i>	Immobilisation	EC50, 48 h	65	EIOX	<i>Selenastrium capricornutum</i>	Wachstum	EC50, 72 h	45	OSBL	4	(SF 1000)	
		<i>Pimephales promelas</i>	Mortalität	LC50, 96 h	96	EIOX	<i>Daphnia magna</i>	Immobilisation	EC50, 48 h	33.5	ILCLD	<i>Scenedesmus subopacatus</i>	Wachstum	EC50, 96 h	4	ILCLD			
		<i>Bretylano rerio</i>	Mortalität	LC50, 96 h	66.2	EIOX	<i>Daphnia magna</i>	Immobilisation	EC50, 48 h	33.5	ILCLD	<i>Selenastrium capricornutum</i>	Wachstum	EC50, 96 h	4	ILCLD			
		<i>Pimephales promelas</i>	Mortalität	LC50, 96 h	9.8	ILCLD						<i>Selenastrium capricornutum</i>	Wachstum	EC50, 96 h	6	ILCLD			
		<i>Pocilia reticulata</i>	Mortalität	LC50, 96 h	30	ILCLD	<i>Daphnia magna</i>	Immobilisation	EC50, 48 h	4.6	EIOX	<i>Scenedesmus subopacatus</i>	Bionasse	NOEC, 96 h	> 10	ILCLD			
		<i>Oryzias latipes</i>	Mortalität	LC50, 48 h	3.7	EIOX	<i>Daphnia magna</i>	Immobilisation	EC50, 48 h	3.8	OSBL	<i>Scenedesmus subopacatus</i>	Wachstum	EC50, 48 h	> 10	ILCLD			
		<i>Carassius auratus</i>	Mortalität	LC50, 96 h	6.1	ECOTOX	<i>Daphnia magna</i>	Immobilisation	EC50, 48 h	3.8	OSBL	<i>Scenedesmus subopacatus</i>	Wachstum	EC50, 48 h	> 10	ILCLD	1.1	(SF 1000)	
		<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Mortalität	LC50, 96 h	1.1	ILCLD	<i>Daphnia magna</i>	Immobilisation	EC50, 48 h	1.9	ILCLD								



## Anhang 4 (Fortsetzung): Vorgehensweise und Quellen

PNEC-Vorschlag beruht auf:

- 1) Recherchierte Toxizitätsdaten (6 Datenbanken)
- 2) PNEC-Ableitungsregeln nach TGD (Technical Guidance Document) des EU-Gefahrstoffrechts  
Sicherheitsfaktor 1000: EC- bzw. LC50-Werte für die 3 Organismenklassen Algen, Kleinkrebse und Fische vorhanden  
Sicherheitsfaktor 100: Ein Langzeit-NOEC für Fische oder Kleinkrebse vorhanden.

Knacker, T. (2003): Preliminary Environmental Risk Assessment (ERA) for Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs). Vortrag gehalten an der ENVIRPHARM in Lyon 14.-16. April 2003, ECT Ökotoxikologie GmbH, 65439 Flörsheim/Main.

LAWA-Projekt Nr. O 10.03: Projektbericht zum Forschungsvorhaben "Entwicklung von Umweltqualitätsnormen zum Schutz aquatischer Biota in Oberflächengewässern für flussgebietspezifische Stoffe" (2005), unveröffentlicht.

Steber, J.; Hater, W. (1997): Ökotoxikologische beurteilung von Kühlwasserbehandlungsmitteln. VGB-Konferenz "Chemie im Kraftwerk 1997", VGB-TB 433, VGB Kraftwerkstechnik GmbH Essen.

Statsbygg (Norwegen) (2002): Revidert brukerveiledning for stedsspesifikk risikovurdering av forurenset grunn pa Fornebu.

HPVIS: High Production Volume Information System der US-EPA (<http://www.epa.gov/hpvis>).

GSBL: Gemeinsamer Stoffdatenpool des Bundes und der Länder ([www.gsbl.de](http://www.gsbl.de)).

HSDB: Hazardous Substances Data Bank der US-National Library of Medicine (<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

IUCLID: "International Uniform Chemical Information Database" nach EU-Gefahrstoffrecht (<http://ecb.jrc.ec.europa.eu/esis/index.php?PGM=dat>).

ECOTOX: Ökotox-Datenbank der US-EPA (<http://cfpub.epa.gov/ecotox>).

ETOX: Ökotox-Datenbank des UBA (<http://webetox.uba.de/webETOX/index.do>).

