

Antibiotika in Oberflächengewässern
Nordrhein-Westfalens

-Herkunft, Eintrag, Verbleib und Relevanz-

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Thorsten Christian

aus

Köln

Bonn 2004

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. R. Galensa
2. Referent: Prof. Dr. M. Keusgen

Tag der Promotion: 17.12.2004

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

INHALT

1	Einführung	001
1.1	Einleitung	001
1.2	Problemstellung	002
2	Grundlagen	005
2.1	Antibiotika in der Anwendung	005
2.1.1	Allgemeines	005
2.1.2	Anwendungsfelder	006
2.1.2.1	<i>Humananwendung</i>	006
2.1.2.2	<i>VeterinÄranwendung</i>	009
2.1.2.3	<i>Anwendung im Pflanzenschutz</i>	011
2.2	Antibiotikaklassen	012
2.2.1	β -Lactamantibiotika	012
2.2.2	Tetracycline	015
2.2.3	Makrolide	017
2.2.4	Sulfonamide und Trimethoprim	020
2.2.5	Gyrasehemmer/Fluorochinolone	023
2.2.6	Lincosamide	025
2.2.7	Aminoglycoside	027
2.3	Resistenzproblematik	030
2.3.1.	AusmaÙ und Bedeutung von Resistenz	030
2.3.2	AuslÖsung von Resistenzen	031

2.4	Einsatzmengen	033
2.4.1	Therapeutische Dosen von Humanarzneimitteln	033
2.4.2	Therapeutische und leistungsfördernde Dosen in der Veterinär Anwendung	035
2.5	Verkaufs- und Absatzmengen	037
2.5.1	Absatz von Antibiotika im Humanbereich	038
2.5.1.1	<i>Amoxicillin</i>	040
2.5.1.2	<i>Cotrimoxazol</i>	041
2.5.1.3	<i>Phenoxymethylpenicillin</i>	041
2.5.1.4	<i>Erythromycin</i>	042
2.5.1.5	<i>Clindamycin</i>	043
2.5.1.6	<i>Ciprofloxacin</i>	043
2.6	Rechtliche Regelungen zu Antibiotika	044
2.6.1	Humanarzneimittel	044
2.6.2	Veterinärarzneimittel	047
2.6.3	Futtermittelzusatzstoffe	050
2.6.4	Regelungen zu diversen Umweltkompartimenten	051
2.6.5	Umweltverträglichkeitsprüfung	053
2.7	Eintrag von Antibiotika in die Umwelt	055
2.7.1	Eintrag von Humanpharmaka	056
2.7.1.1	<i>Körperpassage</i>	056
2.7.1.2	<i>Eintrag ins Abwasser</i>	056
2.7.1.3	<i>Abwasserleitung</i>	057
2.7.1.4	<i>Behandlung des Abwassers</i>	058
2.7.1.5	<i>Entsorgung der Klärschlämme</i>	062
2.7.1.6	<i>Eintrag in die Oberflächengewässer</i>	063
2.7.2	Eintrag von Veterinärpharmaka und Leistungsförderern	065
2.7.2.1	<i>Körperpassage</i>	065
2.7.2.2	<i>Lagerung der Gülle</i>	065
2.7.2.3	<i>Eintrag in Boden</i>	067
2.7.2.4	<i>Eintrag in Gewässer</i>	068
2.7.2.5	<i>Weitere Formen des Eintrags</i>	070

2.7.3	Hydrogeologische und künstliche Mechanismen des Eintrags	071
2.8	Abschätzung der Umweltkonzentrationen	072
2.8.1	Humanarzneimittel	072
2.8.2	Veterinärpharmaka	075
3	Material, Methoden und Methodenentwicklung	077
3.1	Material	077
3.1.1	Geräte	077
3.1.1.1	Flüssigchromatographie, HPLC	077
3.1.1.2	Festphasenextraktion	077
3.1.1.3	Filtration	078
3.1.1.4	beschleunigte Lösemittlextraktion	078
3.1.1.5	ELISA	078
3.1.1.6	sonstiges	079
3.1.2	Chemikalien	080
3.1.2.1	ELISA	080
3.1.2.2	Standardsubstanzen	080
3.1.2.3	weitere Chemikalien	081
3.1.2.4	Lösungsmittel	082
3.1.2.5	Antikörper und Tracer	082
3.1.3	Puffer und Lösungen	082
3.1.4	Stammlösungen und Verdünnungen	084
3.1.1.6	Antibiotikallösungen für ELISA	084
3.1.1.6	Antibiotikallösungen für HPLC	084
3.1.5	Proben	085
3.1.5.1	Gülleproben	085

3.1.5.2	Bodenproben	086
3.1.5.3	Abwasserproben	087
3.1.5.4	Oberflächenwasserproben	088
3.2	Methoden	090
3.2.1	Probenahme	091
3.2.2	HPLC-UV Verfahren	091
3.2.3	SPE-Materialauswahl und Anreicherungsbedingungen	092
3.2.3.1	Materialauswahl	093
3.2.3.2	Vorbereitung der Proben	094
3.2.3.3	Lösungsmittelauswahl	095
3.2.4	Methoden zur Bestimmung von Antibiotika in Wasserproben	096
3.2.4.1	Anreicherung von Wasserproben	096
3.2.4.2	HPLC-MS/MS Verfahren	098
3.2.4.3	Methodenvalidierung	102
	<i>a) Matrixeinfluss</i>	102
	<i>b) Nachweis- und Bestimmungsgrenzen</i>	102
	<i>c) Wiederfindungsraten</i>	103
	<i>d) Varianzen</i>	103
3.2.5	Extraktionsversuche (Gülle)	104
3.2.5.1	Extraktionstemperatur und Anzahl der Extraktionszyklen	104
3.2.5.2	Azideinfluss	105
3.2.5.3	Wiederfindungsrate, Test-Beeinflussung	105
3.2.6	Abbauversuche und Stabilität von Antibiotika in Böden	106
3.2.7	Standard-ELISA-Testverfahren	108
3.2.7.1	Testdurchführung	108
3.2.7.2	Quantifizierung	110
3.2.7.3	Überprüfung von Tracern und Antikörpern	111

3.2.8	Tracersynthesen	112
3.2.8.1	Streptomycin	112
3.2.8.2	Sulfadimidin	120
3.2.9	Entwicklung eines ELISA-Tests zur Bestimmung von SMX	124
3.2.9.1	Synthese eines Bernsteinsäurederivates als Vorstufe	125
3.2.9.2	Kopplung an Peroxidase	125
3.2.9.3	Kopplung an KLH	127
3.2.9.4	Immunisierung	128
3.2.10	Untersuchung von Gülle- und Bodenproben	130
3.2.10.1	Betrieb 1	130
3.2.10.2	Betrieb 2	131
3.2.10.3	Betrieb 3	131
3.2.10.4	Betrieb 4	133
3.2.11	Untersuchung von Abwasserproben	134
3.2.11.1	Kläranlage 1 - Troisdorf	134
3.2.11.2	Kläranlage 2 - Troisdorf-Altenrath	134
3.2.12	Untersuchung von Oberflächenwasserproben	135
3.2.12.1	Proben zum Substanzscreening	135
3.2.12.2	Proben zum Gewässerscreening und zu zeitlichen Untersuchungen	135
4	Ergebnisse und Diskussion	137
4.1	Ergebnisse der Methodenentwicklungen	137
4.1.1	HPLC-UV Verfahren	137
4.1.2	SPE-Materialauswahl und Anreicherungsbedingungen	139
4.1.2.1	Materialauswahl	140
4.1.2.2	Vorbereitung der Proben	140
		141

4.1.2.3	Lösungsmittelauswahl	
4.1.3	Methoden zur Bestimmung von Antibiotika in Wasserproben	142
4.1.3.1	Matrixeinfluss	142
4.1.3.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	145
4.1.3.3	Wiederfindungsraten	149
4.1.3.4	Varianzen	155
4.1.4	Extraktionsversuche (Gülle)	156
4.1.4.1	Einfluss der Extraktionstemperatur und der Anzahl der Extraktionszyklen	156
4.1.4.2	Einfluss von Azid	159
4.1.4.2	Wiederfindungsrate, Test-Beeinflussung	160
4.1.5	Abbauversuche und Stabilität von Antibiotika in Böden	162
4.1.5.1	Vergleich der Extraktionsbedingungen	163
4.1.5.2	Einfluss der Bodenart	164
4.1.5.3	Substanzspezifische Unterschiede	166
4.1.5.4	Einfluss der Sterilisation	167
4.1.5.5	Konzentrationsabhängigkeit der Extraktion	168
4.1.6	Bewertung der Tracersynthesen	170
4.1.6.1	Streptomycin	170
4.1.6.2	Sulfadimidin	172
4.1.7	Entwicklung eines ELISA-Test auf Sulfamethoxazol	177
4.1.7.1	Test der Zwischenprodukte	177
4.1.7.2	Kopplung von SMX an Peroxidase	179
4.1.7.3	Kopplung von SMX an KLH	180
4.1.7.4	Test der Antikörper	182
4.2	Ergebnisse der Probenmessungen	187
4.2.1	Gülle- und Bodenproben	187
4.2.1.1	Betrieb 1	187
4.2.1.2	Betrieb 2	189

4.2.1.3	Betrieb 3	189
4.2.1.4	Betrieb 4	192
4.2.2	Abwasser	193
4.2.2.1	Kläranlage 1 - Troisdorf	193
4.2.2.2	Kläranlage 2 - Troisdorf-Altenrath	196
4.2.3	Oberflächenwasser	198
4.2.3.1	Substanzscreening	198
	<i>a) Penicilline, Aminopenicilline</i>	199
	<i>b) Tetracycline</i>	199
	<i>c) Fluorochinolone</i>	200
	<i>d) Lincosamide und Makrolide</i>	200
	<i>e) Sulfonamide und Trimethoprim</i>	202
	<i>f) Diversität der Flüsse</i>	205
4.2.3.2	Gewässerscreening	207
	<i>a) Erläuterungen zur Substanzauswahl</i>	207
	<i>b) Erläuterungen zur Gewässerauswahl</i>	209
	<i>c) Erläuterungen zur Bedeutung des Probenahmezeitpunktes</i>	211
	<i>d) Screening von Fließgewässern</i>	212
	<i>e) Untersuchung eines stehenden Gewässers</i>	215
4.2.3.3	Tagesgang	216
4.2.3.4	Monatszeitreihen	220
	<i>a) Variation in einzelnen Gewässern</i>	221
	<i>b) Wasserabflussmengen in Oberflächengewässern</i>	227
	<i>c) Abwasseranteile in Oberflächengewässern</i>	232
	<i>d) Konzentrationen von Antibiotika in Kläranlagenabläufen</i>	239
	<i>e) Ermittlung der Frachten in den Gewässern</i>	246
	<i>f) Frachten pro Einwohner</i>	254
4.2.4	Bedeutung der Konzentrationen und Frachten für die Umwelt	268
4.2.4.1	Allergien	268
4.2.4.2	Kläranlagenprozesse	269

4.2.4.3	Wirkung auf Organismen	271
4.2.4.4	Resistenzbildungen	273
4.2.5	Konsequenzen und Maßnahmen	276
5	Anhang	279
5.1	Abkürzungsverzeichnis	279
5.2	Herstellerfirmen von Geräten, Vertreiber von Chemikalien	282
6	Literatur	284

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	<i>Grundstrukturen der β-Lactamantibiotika</i>	S. 013
Abbildung 2:	<i>Strukturen von Tetracyclinen und den zugehörigen 4-Epimeren</i>	S. 015
Abbildung 3:	<i>Strukturen verschiedener Makrolide</i>	S. 018
Abbildung 4:	<i>Strukturen von Sulfonamiden und Trimethoprim</i>	S. 021
Abbildung 5:	<i>Strukturen von Gyrasehemmern/Fluorochinolonen</i>	S. 024
Abbildung 6:	<i>Strukturen von Clindamycin und Lincomycin</i>	S. 026
Abbildung 7:	<i>Strukturen von Streptomycin und Gentamicin</i>	S. 029
Abbildung 8:	<i>Eintragspfade von Antibiotika</i>	S. 055
Abbildung 9:	<i>Beispiel eines Checkerboards zur Überprüfung der SMX-Tracer-, SMX-Antikörper-Kombination</i>	S. 111
Abbildung 10:	<i>Chromatogramm von drei Sulfonamiden</i>	S. 137
Abbildung 11:	<i>Chromatogramm von drei Penicillinen, Entstehung der Methylester von PCG und PCV nach Lagerung in Methanol</i>	S. 138
Abbildung 12:	<i>Chromatogramm von drei Tetracyclinen und Fluorochinolonen</i>	S. 139
Abbildung 13:	<i>Darstellung der Bestimmung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach dem Verfahren der DIN 32645</i>	S. 146
Abbildung 14:	<i>Beispiels-WDF nach dem Kalibrierkurvenverfahren</i>	S. 150
Abbildung 15:	<i>Beispiels-WDF nach dem Kalibrierkurvenverfahren, Anpassung der Gerade durch den Ursprung</i>	S. 151
Abbildung 16:	<i>Ermittlung der Wiederfindung von SMX anhand der mittleren Wiederfindungsraten</i>	S. 154
Abbildung 17:	<i>Ermittlung der Wiederfindung von SMX anhand des Eichkurvenverfahren</i>	S. 155
Abbildung 18:	<i>Konzentration an Sulfadimidin in einer Schweinegülle in Abhängigkeit von der Extraktionstemperatur</i>	S. 156
Abbildung 19:	<i>Konzentration an Sulfadimidin in einer Schweinegülle in Abhängigkeit von der Anzahl der Extraktionszyklen</i>	S. 157
Abbildung 20:	<i>Darstellung der Ist- und Sollkonzentrationen aus der ELISA-Messung von Sulfadimidin in Schweinegüllextrakten</i>	S. 160
Abbildung 21:	<i>Darstellung der Ist- und Sollkonzentrationen aus der ELISA-Messung von Sulfadimidin in verdünnter Schweinegülle</i>	S. 161
Abbildung 22:	<i>Einfluss der Extraktionstemperatur auf die Ausbeute von SMX und SDZ aus Boden</i>	S. 163
Abbildung 23:	<i>Einfluss des Bodens auf die Extraktionsausbeute, am Beispiel von SDZ und SMX ; Extraktion bei 40 °C</i>	S. 164

Abbildung 24:	<i>Einfluss des Bodens auf die Extraktionsausbeute, am Beispiel von SDZ und SMX; Extraktion bei 100 °C</i>	S. 165
Abbildung 25:	<i>Einfluss von Azid auf die Extraktion von Böden</i>	S. 167
Abbildung 26:	<i>Einfluss der Dotierungsstufe auf die Extraktion von Sulfadimidin aus verschiedenen Böden</i>	S. 169
Abbildung 27:	<i>ELISA-Tests des SDM-Tracers 1</i>	S. 173
Abbildung 28:	<i>ELISA-Tests des SDM-Tracers 2</i>	S. 174
Abbildung 29:	<i>ELISA-Tests der SDM-Tracer 3 und 4</i>	S. 176
Abbildung 30:	<i>Chromatogramme von Sulfonamidstandards, Succ-SMX und NHS-Succ-SMX</i>	S. 178
Abbildung 31:	<i>Test des SMX-Bernsteinsäure-Tracers im SDM-Testformat; Kreuzreaktivität des SDM-Antikörpers gegen SMX</i>	S. 179
Abbildung 32:	<i>Gelfiltrationskurven des SMX-KLH Kopplungsproduktes und des SMX Tracers</i>	S. 181
Abbildung 33:	<i>Test des SMX-Antikörpers; Bestimmung der Kreuzreaktivität des Antikörpers gegen Succ-SMX</i>	S. 183
Abbildung 34:	<i>Messung von Kläranlagenzulaufproben per ELISA</i>	S. 195
Abbildung 35:	<i>Gehalte von Makroliden und Lincosamiden in Oberflächengewässern im Großraum Köln-Bonn</i>	S. 201
Abbildung 36:	<i>Darstellung des Verhältnisses von Sulfamethoxazol zu Trimethoprim in Oberflächengewässern</i>	S. 203
Abbildung 37:	<i>Darstellung der Kreiskarte mit den eingezeichneten Probenahmegebieten in Nordrhein-Westfalen</i>	S. 210
Abbildung 38:	<i>Tagesgang der Antibiotikakonzentrationen in der Wupper bei Leverkusen-Rheindorf</i>	S. 216
Abbildung 39:	<i>Jahresentwicklung der Summenkonzentrationen von neun Antibiotika in verschiedenen Oberflächengewässern</i>	S. 223
Abbildung 40:	<i>Konzentrationen von Trimethoprim, Clindamycin, Erythromycin und Sulfamethoxazol im Jahresverlauf in Agger, Bröl, Erft und Sieg</i>	S. 225
Abbildung 41:	<i>Darstellung der Antibiotikakonzentrationen und der Wasserabflussmengen der Sieg im Jahresverlauf</i>	S. 227
Abbildung 42:	<i>Darstellung der Antibiotikakonzentrationen und der Wasserabflussmengen von acht Flüssen im Jahresverlauf</i>	S. 228
Abbildung 43:	<i>Darstellung der Summenkonzentrationen von neun Antibiotika und des Abwasseranteiles der Sieg im Jahresverlauf</i>	S. 234
Abbildung 44:	<i>Darstellung der Antibiotikakonzentration und des Abwasseranteiles in acht Flüssen im Jahresverlauf</i>	S. 235
Abbildung 45:	<i>Korrelation zwischen Antibiotikakonzentrationen in verschiedenen Gewässern und den jeweiligen Abwasseranteilen</i>	S. 237

Abbildung 46:	<i>Variation der theoretischen Abwasserkonzentrationen in Flüssen Nordrhein-Westfalens innerhalb des Jahresverlaufes</i>	S. 244
Abbildung 47:	<i>Entwicklung der Antibiotikakonzentrationen in theoretischen Abwässern im Jahresverlauf</i>	S. 245
Abbildung 48:	<i>Summe der Tagesfrachten in Agger und Wupper im Jahr 2003</i>	S. 247
Abbildung 49:	<i>Entwicklung der Tagesfrachten (Summe von neun Antibiotika) pro Einwohner im Jahresverlauf</i>	S. 255
Abbildung 50:	<i>Entwicklung der Tagesfrachten von Sulfamethoxazol pro Einwohner im Jahresverlauf</i>	S. 256
Abbildung 51:	<i>Darstellung der Stickstoffminderungsraten in den Flussgebieten und den mittleren Gesamtfrachten</i>	S. 265
Abbildung 52:	<i>Darstellung der Phosphoreliminationsraten in den Flussgebieten und den mittleren Gesamtfrachten</i>	S. 267

Tabellenverzeichnis

Table 1:	<i>Antibiotika-Klassen, Häufigkeiten der Verschreibung und DDD der Hauptvertreter</i>	S. 001
Table 2:	<i>Halbwertszeiten, Applikationshäufigkeit, und errechnete tägliche Dosen verschiedener Antibiotika bei oraler Applikation</i>	S. 034
Table 3:	<i>Zieltierarten und Grenzwerte für antimikrobielle Leistungsförderer in Alleinfuttermitteln</i>	S. 036
Table 4:	<i>Einsatzmengen von Antibiotika in der EU (inkl. Schweiz)</i>	S. 037
Table 5:	<i>Verkaufsmengen von verschiedenen, absatzstarken Antibiotika der Humananwendung in 1998 und 2001</i>	S. 039
Table 6:	<i>Jahresaufwandmengen verschiedener Antibiotika</i>	S. 044
Table 7:	<i>PEC von Humanantibiotika in Kläranlagenzuläufen, -abläufen und Oberflächengewässern</i>	S. 074
Table 8:	<i>Zeitpunkt der Gülleprobenahme, Herkunft und Art der Gülleproben</i>	S. 085
Table 9:	<i>Zeitpunkt der Bodenprobenahme, Beschreibung der vorher erfolgten Behandlung der Böden</i>	S. 087
Table 10:	<i>Orte der Probenahme der Oberflächenwasserproben</i>	S. 089
Table 11:	<i>HPLC- und UV-Bedingungen zur Trennung und Detektion von Sulfonamiden, Penicillinen, Tetracyclinen, Fluorochinolonen</i>	S. 091
Table 12:	<i>Substanzen, die in der Methode von Färber et al. erfasst werden</i>	S. 096
Table 13:	<i>Arbeitsschritte zur Anreicherung von Oberflächenwasserproben</i>	S. 097
Table 14:	<i>Elutions- und HPLC-Bedingungen zur LC-MS/MS-Messung</i>	S. 098
Table 15:	<i>Geräteparameter der MS/MS-Bestimmung – Teil 1</i>	S. 099
Table 16:	<i>Geräteparameter der MS/MS-Bestimmung – Teil 2</i>	S. 100
Table 17:	<i>Molekülmassen der MS-MS Detektion</i>	S. 101
Table 18:	<i>Arbeitsschritte zur ELISA-Messung von Sulfadimidin und Sulfamethoxazol</i>	S. 108
Table 19:	<i>Verdünnungen und Dotierungen von Kläranlagenproben zur Bestimmung des Matrixeinflusses im ELISA-Test auf SMX</i>	S. 134
Table 20:	<i>Signal/Rausch-Verhältnisse bei der LC-MS/MS Bestimmung; NG und BG bei S/N-Verhältnissen von 10:1 bzw. 3:1</i>	S. 143
Table 21:	<i>Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von Antibiotika in dotiertem Laborleitungswasser</i>	S. 147
Table 22:	<i>Beispiel zur Unterschiedlichkeit der WDF-Bestimmung</i>	S. 150
Table 23:	<i>Wiederfindungsraten von neun Antibiotika in Laborleitungswasser</i>	S. 152

Tabelle 24:	<i>Konzentrationen von vier Antibiotika in der Erft</i>	S. 155
Tabelle 25:	<i>Gehalte von Sulfadimidin in verschiedenen Güllen und in damit beaufschlagtem Boden</i>	S. 189
Tabelle 26:	<i>Gehalte von Sulfadimidin in weiteren Güllen und in damit beaufschlagtem Boden</i>	S.190
Tabelle 27:	<i>Antibiotikakonzentrationen in der Pflanzenkläranlage Troisdorf-Altenrath</i>	S. 196
Tabelle 28:	<i>Antibiotika-Gehalte in Oberflächengewässern in Ostwestfalen, Niederrhein, Großraum Köln-Bonn</i>	S. 206
Tabelle 29:	<i>Untersuchte Antibiotika in Oberflächenwasser, ihre Antibiotikaklassen und Anwendungsorganismen</i>	S. 208
Tabelle 30:	<i>Gesamtantibiotikakonzentrationen in Gewässern verschiedener Regionen Nordrhein-Westfalens</i>	S. 214
Tabelle 31:	<i>Konzentrationen von vier Antibiotika in Tagesgangproben der Wupper</i>	S. 217
Tabelle 32:	<i>Anteile von Abwasser in Oberflächengewässern im Raum Köln-Bonn im Jahresverlauf</i>	S. 233
Tabelle 33:	<i>Theoretische Summenkonzentrationen von neun Antibiotika in Kläranlagenabwässern</i>	S. 239
Tabelle 34:	<i>Theoretische Konzentrationen von Sulfamethoxazol in Kläranlagenabwässern</i>	S. 240
Tabelle 35:	<i>Tagesfrachten von neun Antibiotika (Summe) in Oberflächengewässern im Großraum Köln-Bonn im Jahresverlauf</i>	S. 246
Tabelle 36:	<i>Tageseinzelfracht von Erythromycin in Oberflächengewässern im Großraum Köln-Bonn im Jahresverlauf</i>	S. 250
Tabelle 37:	<i>Jahresfrachten von CLI, ERY, SMX und TRI in vier großen Flüssen im Großraum Köln-Bonn</i>	S. 253
Tabelle 38:	<i>Jahresfrachten von CLI, ERY, SMX und TRI in vier großen Flüssen im Großraum Köln-Bonn, umgerechnet auf eine Gesamtbevölkerung von 80 Mio. Einwohnern</i>	S. 253
Gleichung 1:	<i>Formel zur Abschätzung der Umweltkonzentration von Stoffen im Kompartiment Abwasser</i>	S. 073
Gleichung 2:	<i>Formel zur Abschätzung der Umweltkonzentration von Stoffen im Kompartiment Oberflächenwasser</i>	S. 073
Gleichung 3:	<i>4-Parameter-Kurve nach Rodbard</i>	S. 110

Verzeichnis der Reaktionsgleichungen

Reaktion 1:	<i>Einfügung einer Aminofunktion in das Streptomycinmolekül</i>	S. 113
Reaktion 2:	<i>Blockierung der Aminofunktionen an der Peroxidase und Oxidation mit Periodat zur Oxidation der Kohlenhydrat-Seitenkette</i>	S. 113
Reaktion 3:	<i>Reaktion von derivatisiertem Streptomycin mit oxidiertem Peroxidase</i>	S. 114
Reaktion 4:	<i>Aktivierung von Peroxidase durch Reaktion mit Glutardialdehyd</i>	S. 115
Reaktion 5:	<i>Reaktion von Guanidinfunktionen des Streptomycins mit aktivierter Peroxidase</i>	S. 116
Reaktion 6:	<i>Reaktion der Aminofunktion des Streptomycin-Hydrazons mit aktivierter Peroxidase</i>	S. 117
Reaktion 7:	<i>Reaktion der Säurefunktion mit NHS und DCC zum aktivierten Ester</i>	S. 118
Reaktion 8:	<i>Kopplung des aktivierten Esters mit den Aminofunktionen Peroxidase</i>	S. 118
Reaktion 9:	<i>Reaktion von Streptomycin mit Carboxymethoxylamin</i>	S. 118
Reaktion 10:	<i>Reaktion von Streptomycin mit Peroxidase</i>	S. 120
Reaktion 11:	<i>Reaktion von Sulfadimidin mit oxidiertem Peroxidase</i>	S. 121
Reaktion 12:	<i>Reaktion von Sulfadimidin mit aktivierter Peroxidase</i>	S. 122
Reaktion 13:	<i>Reaktion von Sulfonamiden mit Carbonsäureanhydriden</i>	S. 123

1. Einführung

1.1 Einleitung

Nach über sechzig Jahren der erfolgreichen und heilsamen Anwendung von Antibiotika in der Medizin [1, 2], zählen diese Substanzen wohl zu den erstaunlichsten und wichtigsten Pharmaka, die im zwanzigsten Jahrhundert ihren Siegeszug angetreten haben. Heutzutage sind sie als Heilbringer kaum mehr aus unserem Leben wegzudenken. Wer mag sich noch vorstellen, dass, in unserer modernen Sichtweise, harmlose Entzündungen oder vergleichsweise simple bakterielle Infektionen noch vor weniger als achtzig Jahren durchaus als ernstzunehmende und lebensbedrohende Gefahr galten. Seit der glücklichen Entdeckung der ersten Antibiotika ist uns die Angst vor diesen Gefahren weitestgehend genommen.

Doch die Beschreibung „erstaunlich“ deutet schon an, dass es auch weitere, nicht nur optimistische Einstellungen gegenüber diesen Wirkstoffen gibt. Mitunter erhält man sogar den Eindruck, dass weitverbreitete Meinungen bestehen, die besonders kritisch oder gar ablehnend zu diesen Stoffen stehen, die doch unbestritten Millionen von Menschen gerettet haben. Was haben diese Stoffe an sich, das sie so ambivalent erscheinen lässt? Erklärung dafür bieten zwei Gründe, einer substanzspezifisch, der andere eher unglücklicherweise und durch die Vielseitigkeit der Schöpfung bedingt.

Manche der Stoffe sind allergieauslösend [3-5], was ihre Behandlung bei prädestinierten Personen ausschließt und mit ernstzunehmenden Komplikationen verbunden wäre. Der andere Grund liegt in dem Mechanismus der Resistenzentwicklung bei Bakterien, durch die eine erfolgreiche Behandlung von Infektionen stark erschwert werden kann [6-11].

Aufgrund dieser Möglichkeiten jedoch gänzlich auf Antibiotika verzichten zu wollen oder sogar Angst vor ihrer Anwendung zu haben, wäre nicht ratsam und sogar gefährlich.

Daher ist eine Praxis des umsichtigen und verantwortungsvollen Einsatzes der richtigen Mittel-Weg, als ein unbekümmerter Einsatz oder aber ein gänzlicher Verzicht aus Furcht vor den Risiken. Außerdem ist die therapeutische und gegebenenfalls prophylaktische Anwendung bei Mensch und Tier gerade aus ethischen Gründen nicht in Frage zu stellen.

Haben wir uns entschlossen, Substanzen zu nutzen, die unser Leben schützen sollen, müssen wir uns andererseits aber auch über die Konsequenzen dieser Nutzung bewusst werden. Die Frage, die sich direkt aus der Anwendung ergibt ist, was mit den Substanzen nach ihrer Einnahme oder Anwendung geschieht. Da ein vollständiger Abbau der Stoffe auch nach

Aufnahme in und Passage durch den Körper nicht geschieht, ist klar, dass sich Rückstände, sowie Metaboliten in den Ausscheidungen wie Urin und Fäces finden lassen. Damit ist der Eintragspfad in die Umwelt via Abwasser und Gülle vorbestimmt. Um sich bewusst zu machen, was die aktuelle Anwendungspraxis umfassend bedeutet, ist es nicht nur wichtig, Klarheit über das Auftreten von Resistenzen im Krankenhausbereich (inklusive der dort anfallenden Abwässer), als den Ort einer verstärkten Anwendung, oder direkt im Körper von Mensch und Tier beobachtend zu erlangen, sowie das Auftreten von Allergien zu erfassen, sondern ergänzend auch die Situation in der Umwelt zu beleuchten und zu bewerten [12-14].

Somit sieht die sich damit befassende organische Umweltanalytik mit ihren Kompetenzen auf dem Gebiet der Analytik und der Chemie, ihre Aufgaben und Verantwortungen auch im Bereich des Umweltschutzes und auf dem Gebiet des gesundheitlichen Verbraucherschutzes. Sie vermag es, auftretende Konzentrationen von Rückständen und von Metaboliten in der Umwelt zu erfassen und mit Hilfe angrenzender Disziplinen zu bewerten. Ihre Erkenntnisse werden gesucht, geschätzt und von verschiedensten Interessengruppen genutzt. Einerseits kann die Industrie mit dem Wissen und den Erfahrungen der organischen Umweltanalytik Schlüsse ziehen und in Neuentwicklungen von Pharmaka einfließen lassen. Andererseits ergeben sich für die Politik Folgerungen, die sich in Weichenstellungen in der Chemikalienpolitik auswirken.

Mit dieser Arbeit soll dazu beigetragen werden, die Datenlage über das Auftreten von Antibiotika in der Umwelt und die Wege des Eintrages zu verbreitern und zu aktualisieren. Ergänzend zu Beobachtungen von Resistenzentwicklungen und Allergieausbreitungen kann sie helfen, eine objektive Sichtweise und Einschätzung, sowie eine fundierte Bewertung über den Gesamtkomplex der Folgen der Antibiotikaaanwendung zu erhalten.

1.2 Problemstellung

Nachdem seit Ende der Neunziger Jahre vereinzelt über das Vorkommen von Arzneimitteln in der aquatischen Umwelt berichtet wurde [15-23] und dabei gelegentlich auch Rückstände mancher Antibiotika nachgewiesen wurden, sollte differenziert betrachtet werden, wie ein Eintrag zustande kommt, ob dieser primär durch Anwendung im Humanbereich zustande kommt, oder ob auch die Anwendung in der Veterinärmedizin und der Landwirtschaft für

gewisse Anteile mitverantwortlich ist. Das Hauptaugenmerk war dabei auf das Kompartiment Wasser, speziell Oberflächenwasser, zu richten, in das ein Eintrag aus beiden Anwendungsbereichen vorstellbar war, das vergleichsweise empfindlich mittels Multimethode auf Substanzen sowohl aus der Human-, als auch aus der Veterinär Anwendung zu messen war, und mit seinen Einzugsbereichen ein gutes Abbild für Einträge aus ganzen Regionen darstellt. Durch Beprobung vieler verschiedener Standorte innerhalb von Nordrhein-Westfalen sollten regionale Unterschiede erkannt werden, die in Zeitreihenuntersuchungen weiter verfolgt werden sollten.

Ergänzend dazu wurden Untersuchungen von Gülleproben, Böden und Kläranlagenwässern durchgeführt, die entweder auf Mehrstoffmessungen per HPLC-MS/MS in Bezug auf Abwasser analog zu den Oberflächenwässern, oder auf Einzelstoffmessungen per ELISA in Bezug auf Gülle- und Bodenproben basierten. Dazu war es einerseits nötig, bestehende ELISA-Tests auf die Messung von Zielstoffen in umweltrelevanten Matrices und Konzentrationen anzupassen, Tests nach Immunogen- und Tracersynthesen, sowie Antikörpergewinnung nach Immunisierung neu aufzubauen, und andererseits eine Anreicherungsmethode mittels Festphasenextraktion zu entwickeln, durch die Antibiotikarückstände im ng/L-Bereich nach Aufkonzentrierung mit entsprechendem Anreicherungsfaktor mit Hilfe einer bestehenden HPLC-MS/MS Methode im Extrakt gemessen werden können.

Zunächst war es wichtig, in Screeninguntersuchungen zu ermitteln, ob eine Belastung vorliegt, und welche Substanzen in Konzentrationen welcher Höhe zu finden sind, um danach genauer auf die Unterschiede zwischen verschiedenen Flussgebieten einzugehen und Ursachen für die gefundenen Eigenarten mancher Gebiete zu finden. Wichtig war auch die Betrachtung der Entwicklung im Jahresverlauf, um besonders dadurch zu ermitteln, ob neben eventuellen regionalen gewässerspezifischen Belastungs- und Gefährdungsschwerpunkten auch innerhalb des Jahresverlaufs kritische und ernst zu nehmende Gehalte an Rückständen auftreten können, die in vereinzelt Stichprobenuntersuchungen nicht zwangsläufig zu erkennen sind, die möglicherweise aber dennoch auftreten und ebenfalls ein Risikopotential für Umwelt oder Mensch haben könnten.

2. Grundlagen

2.1. Antibiotika in der Anwendung

2.1.1 Allgemeines

Der amerikanische Mikrobiologe Selman Abraham Waksman prägte Anfang der 40er Jahre des 20. Jahrhunderts den dem Griechischen entlehnten Begriff „Antibiotika“ (anti = gegen, entgegen und biotikos = zum Leben gehörig), in seiner ursprünglichen Bedeutung, für solche Stoffe, die niedermolekulare Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen sind und die in geringen Konzentrationen andere Mikroorganismen in ihrem Wachstum hemmen oder sie abtöten [2, 24, 25]. Dabei handelt es sich im eigentlichen Sinne um Stoffe mit Molekülmassen von weniger als 2000 g/mol und nicht um Enzyme, Toxine oder um komplexe Proteine. Mit der Entdeckung einer anderen antibiotisch wirkenden Substanzklasse, nämlich die der Peptidantibiotika (z.B. Bacitracin, Vancomycin, Cyclosporin A), wurde die Definition insofern erweitert, dass nunmehr auch solche Stoffe mit eingeschlossen sind, die deutlich größere Molekülmassen aufweisen [26, 27]. Auch die Beschränkung auf Stoffe rein mikrobiologischen Ursprungs hat im heutigen Sprachgebrauch nicht mehr Bestand, womit nun biosynthetisch, semisynthetisch und vollsynthetisch (z.B. die eigentlichen Chemotherapeutika) hergestellte Substanzen ebenfalls als Antibiotika bezeichnet werden können [7].

Es wird geschätzt, dass insgesamt mehr als 8000 verschiedene Antibiotika mikrobiellen Ursprungs existieren [2]. Allerdings ist eine Vielzahl von Ihnen nicht auf verschiedenartige Funktionsmechanismen begründet, sondern auf Nebenkomponenten aus Fermentationen bekannter Substanzen. Zusätzlich gibt es neben dieser Anzahl der aus Bakterien und Pilzen gewonnenen Antibiotika, sowie deren Derivate noch eine Vielzahl (schätzungsweise 3000), die aus Flechten, Algen, tierischen Organismen und vor allem Pflanzen entstammen. Die wichtigsten Produzenten mikrobieller Antibiotika sind *Actinomyceten* (65 % der Gesamtzahl), vor allem *Streptomyceten*. Daneben ist der Ursprung von 13 % in der Produktion durch Eubakterien, hier v.a. *Bacillus*-Arten (zumeist Peptidantibiotika) und von 22 % durch Pilze zu sehen.

Obwohl diese Vielzahl von Stoffen bekannt ist, sie alle antibiotisch wirken und somit auch ein potenzieller Einsatz als Arzneimittel denkbar ist, dazu noch jedes Jahr ein paar Hundert

weitere Substanzen neu hinzukommen, sind es trotzdem nur wenig mehr als einhundert, die tatsächlich insgesamt in der Medizin zum Einsatz kommen.

Unterscheidungen können zwischen den Antibiotika in Bezug auf ihr Anwendungsgebiet, den Anwendungsorganismus, die Applikationsart, den Wirkmechanismus, ihre wirtschaftliche Bedeutung, ihre Herkunft oder ihren chemischen Stoffklassen geschehen. Die üblichste ist die letztere, aufgrund derer auch hier eine allgemeine Klassifizierung geschehen soll. Zunächst werden aber die verschiedenen Möglichkeiten der Anwendung dargestellt.

2.1.2 Anwendungsfelder

Die Anwendung von Antibiotika ist in verschiedensten Bereichen möglich und üblich. Dabei ist mit Sicherheit, allein von den Verschreibungszahlen und den Umsatzmengen gesehen, die humantherapeutische und humanprophylaktische Anwendung an erster Stelle und als wichtigstes Einsatzgebiet zu sehen [5, 28]. Neben dieser Anwendung beim Menschen ist auch der veterinärmedizinische Bereich inklusive der Futtermittel von großer Bedeutung [27, 29-31]. Dabei ist eine Unterscheidung zwischen der Anwendung im Bereich der Groß- und Nutztiere zwecks Nahrungsmittelproduktion und dem des Heim- und Kleintierbereiches zu sehen. Als drittes Gebiet der Nutzung von Antibiotika ist die Anwendung in einem weiteren Bereich der Landwirtschaft, nämlich dem des Obstbaus, von Bedeutung [32-34]. Auf die sonstige Anwendung im Bereich von Zellkulturen im medizinisch/diagnostischen Bereich soll hier nur hingewiesen werden, da durch diese ebenfalls nicht zu vernachlässigende Mengen an Antibiotika verwendet werden, diese aber aufgrund der speziellen Handhabung in mikrobiologischen Labors für die hier bearbeitete Themenstellung keine Bedeutung haben. Dies betrifft auch die Verwendung zur Konservierung von Nahrungsmitteln, z.B. Natamycin oder Nisin [35].

2.1.2.1 Humananwendung

Das mengenmäßig größte Einsatzgebiet von Antibiotika ist die therapeutische Behandlung von Infektionen beim Menschen. Dazu zählen sowohl systemische, als auch lokale Infektionen. Daher sind Antibiotika bei verschiedensten Indikationen häufig die Mittel der Wahl, können also bei unterschiedlichsten Krankheitsbildern angewandt werden. Gemäß der Roten Liste (Arzneimittelverzeichnis für Deutschland, untergliedert in Medikamente und Materialien aus 88 Hauptgruppen) [36] werden Antibiotika sowohl bei allgemeinen

Infektionen, als auch zur Therapie bestimmter Infektionsherde eingesetzt, so dass sie sich nicht nur in der Arzneimittel-Hauptgruppe der Antibiotika finden lassen, sondern auch unter den Hauptgruppen der Antimykotika, der Antitussiva/Expektorantia, der Gynäkologika, der Magen-Darm-Mittel, der Mund- und Rachentherapeutika, der Ophthalmika (Augenheilmittel), der Otologika (Ohrenheilmittel), der Rhinologika (Nasenheilmittel), der Urologika, der Wundbehandlungsmittel und der Zytostatika. Neben dieser Anwendung zur direkten Bekämpfung von Infektionen, gibt es auch die umstrittene prophylaktische Anwendung, z.B. bei der Verschreibung im Falle einer Bronchitis, die in mehr als 90 % der Fälle durch Viren verursacht ist, gegen die Antibiotika nicht wirken, wodurch aber einer Infektion des geschwächten Körpers durch Bakterien vorgebeugt werden soll [37]. Dazu werden üblicherweise die gleichen Präparate verwendet, die auch zur therapeutischen Behandlung zum Einsatz kommen.

Die bedeutendste Substanzklasse der Antiinfektiva stellen die β -Lactamantibiotika dar, zu denen sowohl die Penicilline, als auch die Aminopenicilline gehören, und die mit einer Gesamtverordnungszahl von 109,0 Mio. DDD¹ im Jahr 2002 deutschlandweit am häufigsten verschrieben wurden (siehe Tab. 1). Davon entfielen 72,1 Mio. DDD auf die Aminopenicilline, hauptsächlich Amoxicillin, und 36,9 Mio. DDD auf die klassischen Penicilline, vorwiegend Phenoxymethylpenicillin (PCV). Mit 63,1 Mio. DDD stellen die Tetracycline, mit 90 % Anteil allein von Doxycyclin, die nächstwichtigste Klasse, vor den Makroliden inkl. Clindamycin (CLI) mit 55,6 Mio. DDD (Roxithromycin 19,9 Mio. DDD, Clarithromycin 11,8 Mio. DDD, Erythromycin 9,0 Mio. DDD), dar. Etwa gleichhäufige Verschreibungen verzeichnen die Klassen der Fluorochinolone mit dem bekanntesten Vertreter Ciprofloxacin, der Sulfonamide mit dem Kombinationswirkstoff Cotrimoxazol[®] (Sulfamethoxazol (SMX) + Trimethoprim (TRI) 5:1), und der Cephalosporine, z.B. Cefaclor; alle Klassen etwa 25-30 Mio. DDD [37].

Insgesamt gab es im Jahr 2002 in der Indikationsgruppe der Antibiotika und Chemotherapeutika 42,2 Mio. Verordnungen, was gegenüber dem Vorjahr einen Rückgang um 0,8 % bedeutet. Um diese Zahl der Gesamtverordnungen mit der Gesamtzahl der Verordnungen in Tagesdosen zu vergleichen, muss sie sowohl mit der mittleren Anwendungsdauer in Tagen, als auch mit der durchschnittlichen täglichen Dosis multipliziert werden.

¹ DDD

defined daily dose, durchschnittliche Tagesdosis auf Basis von Werten des WHO Collaboration Centre for Drug Statistics Methodology

Table 1: *Antibiotika-Klassen, sowie Häufigkeiten der Verschreibung und DDD der Hauptvertreter*

Substanzklasse Hauptvertreter	Verordnungen 2002 - [Mio. DDD]	Änderung zu 2001 - gesamt [%]	DDD [g/Tag; orale Applikation]
Penicilline	36,9	- 4,0	
PCV	32,8	- 4,0	2
Aminopenicilline	72,1	+ 5,4	
Amoxicillin	66,2	+ 5,5	1
Tetracycline	63,1	- 0,8	
Doxycyclin	58,6	- 0,8	0,1
Makrolide inkl. CLI	55,6	- 2,6	
Roxithromycin	19,9	- 6,9	0,3
Fluorochinolone	27,1	+ 19,2	
Ciprofloxacin	6,9	- 4,2	1
Sulfonamide	25,2	- 6,3	
SMX + TRI	24,5	- 5,8	2 bzw. 0,4
Cephalosporine	27,7	+ 4,3	
Cefaclor	8,3	+ 17,5	1
gesamt	307,7		

Der Großteil der Antibiotika wird vor allem bei allgemeinen Infektionen oral eingenommen, wodurch eine Verteilung der Substanzen im Körper, nach der Aufnahme im Magen-Darm-Trakt gewährleistet wird. Auch die parenterale Applikation führt dazu, dass die Stoffe im Körper weiter verbreitet werden. Bei manchen Indikationen, wie z.B. lokalen Infektionen ist jedoch eine dritte Darreichungsform angebracht, bei der die Antibiotika direkt an der betroffenen Stelle angewendet werden. Häufig ist dies bei den Gynäkologika und den Ophthalmika (Augenheilmittel) der Fall; dazu können die Antibiotika äußerlich als Tropfen oder dermal als Salben und Cremes aufgetragen werden.

Ein weiterer wichtiger und häufiger Einsatzbereich, bei dem die Wirkstoffe vor allem topisch, also auf der Haut angewendet werden, ist der als Dermatika und als Stoffe zur Wundbehandlung. Insgesamt zählen die Dermatika zu den verordnungstärksten Arzneimitteln in Deutschland, wovon die Gruppe der Aknemittel etwa 8 % der Verordnungen

in Tagesdosen ausmacht (gesamt 794 Mio. DDD, Aknemittel 63 Mio. DDD) und die der Antiinfektiva 9 % (73 Mio. DDD). Neben der Anwendung von Fusidinsäure und Gentamicin, welche auch in Ophthalmika häufig eingesetzt werden und der Verwendung von Neomycin, Bacitracin und Sulfadiazin (6,9 Mio. DDD) in antiinfektiven Dermatika, ist auch das Tetracyclin Doxycyclin als intern anzuwendendes orales Aknemittel zu nennen [38], aber vor allem das Makrolid Erythromycin und das Lincosamid Clindamycin als topische externe Aknemittel. Allein in der Verwendung als Einzelpräparat wird Erythromycin mit 9,8 Mio. DDD zur Aknetherapie verschrieben. Dazu kommen noch 8,1 Mio. DDD, in denen es als Kombinationspräparat vorliegt. Im Vergleich dazu beträgt die Verschreibungsmenge von erythromycinhaltigen Präparaten (orale Aufnahme) zur allgemeinen Behandlung von Infektionen lediglich 9,0 Mio. DDD. Die Aknebehandlung ist im Unterschied zu der Behandlung von „normalen“ Infektionen mit einer etwas längeren Therapiedauer verbunden. Dauert eine reine Infektionsbehandlung im Normalfall etwa 3-10 Tage, so kann die Dauer der Aknebehandlung mit topischen Antibiotika auch schon einmal 4-6 Wochen dauern.

2.1.2.2 Veterinär Anwendung

Die Verwendung von Antibiotika im Veterinärbereich lässt sich in zwei große Einsatzgebiete einteilen, nämlich in Therapie und Prophylaxe zur Behandlung von Infektionskrankheiten als Hauptanwendungsgebiet und in den Einsatz zur Leistungsförderung in der Landwirtschaft [7, 27].

Innerhalb des Gebietes der Therapie/Prophylaxe lässt sich eine feinere Unterteilung vornehmen. Hier ist zum einen die Verschreibung im Heim- und Kleintierbereich zu sehen, in dem die prophylaktische Anwendung eher untergeordneten Rang hat, und es statt dessen mehr um die therapeutische Behandlung von Infektionen geht [39]. Der mengenmäßig größere Bedarf ergibt sich aus der Behandlung von Groß- und Nutztieren in der landwirtschaftlichen Tierhaltung. Therapeutisch werden verschiedenste Arten von bakteriellen Infektionen, z.B. des Atmungstraktes, des Magen-Darm-Traktes, der Harnwege und Geschlechtsorgane, sowie Euter- und Gebärmutterentzündungen, Gelenkentzündungen, Haut- und Wundinfektionen, aber auch bakterielle Sekundärerkrankungen bei Virusinfektionen behandelt [40]. Dazu werden die gleichen Antibiotikaklassen verwendet, die auch in der Humanmedizin eingesetzt werden. Mitunter sind es sogar genau die gleichen Wirkstoffe. Bei manchen gibt es allerdings eine strikte Trennung, entweder zulassungsbedingt, oder aber in der Marktpräsenz. So wird bei den Fluorochinolonen in der Veterinärmedizin Enrofloxacin eingesetzt, das nicht im

Humanbereich angewendet wird, dort jedoch Ciprofloxacin, welches nicht zu den Veterinärpharmaka zählt [41]. Gleiches gilt auch im Bereich der Sulfonamide, bei denen Sulfadimidin (vet.) als Pendant Sulfamethoxazol (hum.) gegenübergestellt ist. Sowohl im Heim- und Kleintierbereich, als auch bei den Groß- und Nutztieren gibt es von den Substanzen her keinen Unterschied, es werden die gleichen Wirkstoffe eingesetzt [40].

Der prophylaktische Einsatz wird vorgenommen, um eine bekannte Gefahr für die Gesundheit der Tiere zu vermeiden. Dies ist dann der Fall, wenn einzelne Tiere schon erkrankt sind und die Krankheit droht, auch andere Tiere zu befallen, beispielsweise bei Darminfektionen bei Hühnern, oder bei der Einstallung von Ferkeln aus unterschiedlichen Beständen [27]. Dabei werden ebenfalls die üblichen therapeutischen Antibiotika verwendet. Die Applikation erfolgt häufig aus praktischen Gründen als Zumischung über das Futter, oder das Trinkwasser; bei lokalen Infektionen aber auch durch topisches Auftragen auf die betroffene Stelle. Die Injektion des Mittels ist eine weitere Möglichkeit.

Bei der Leistungsförderung werden die Stoffe ausschließlich dem Futter beigemischt. Sie sollen dazu dienen, die Futtermittelverwertung zu verbessern. Dazu werden sie in subtherapeutischen (nutritiven) Dosen eingesetzt, die nicht ausreichen, um Keime abzutöten, sondern dazu dienen, das Keimspektrum im Verdauungstrakt zu verschieben, sodann den Stoffwechsel der gewünschten Keime etwas zu dämpfen und so ein günstigeres Keimmilieu zu schaffen [30]. Diese Keimbeeinflussung soll dazu führen, dass weniger Eiweiß-Abbauprodukte gebildet werden, die den Stoffwechsel der Tiere belasten könnten und die Nährstoffkonkurrenz zwischen Darmbakterien und Wirtsorganismus gemindert wird. Außerdem findet eine reduzierte Ausscheidung von mikrobiell gebildeten Enzymen und eine dadurch bedingte verminderte Bildung von Ammoniak statt [42, 43]. Durch diese Effekte kann eine höhere Nährstoffverfügbarkeit und eine bessere Nährstoffdurchlässigkeit der Darmwand erzielt werden, wodurch die Futtermittelverwertung verbessert wird, die Tiere schneller wachsen und mehr Fleisch ansetzen.

Was die Antibiotika angeht, die zum Zweck der Leistungsförderung eingesetzt werden, so besteht nach einer Übereinkunft innerhalb der EU der Grundsatz, dass hierfür keine Stoffe zugelassen werden, die in der Humanmedizin zum Einsatz kommen [7]. Es gibt also eine strikte Trennung zwischen den Einzelwirkstoffen zur Therapie und den Futtermittelzusatzstoffen. Allerdings besteht dieser Grundsatz nur für die einzelnen Stoffe, nicht aber für die eingesetzten Antibiotikaklassen, so dass für die verschiedenen Anwendungsbereiche Antibiotika der gleichen Klassen sehr wohl angewendet werden dürfen.

Aktuell sind zum Zweck der Leistungsförderung noch vier Substanzen zugelassen [44], nachdem in den letzten Jahren mehr und mehr Stoffe verboten wurden (seit 1997 Verbot von sieben Stoffen) [5]. Doch auch die Anwendung dieser letzten vier Stoffe soll entsprechend einem Vorschlag der Europäischen Kommission aus dem Jahr 2002 für eine neue Verordnung zur Regelung von Futtermittelzusatzstoffen bis Januar 2006 eingestellt werden [45]. Gemäß einer Entscheidung der EU-Agrarminister wurde dieses komplette Verbot jedoch soweit aufgelockert, als dass das leistungsfördernde Avilamycin auch über 2005 hinaus noch weiter in der Trutenmast verwendet werden darf [46]. Zur Zeit besteht die Zulassung zur Leistungsförderung daneben auch für Ferkel, Schweine und Masthühner.

Ebenfalls in den Bereich der Veterinär Anwendung von Antibiotika fällt die Fischzucht, die aber in Deutschland eher untergeordnete und regionale Bedeutung hat. Werden in Aquakulturen Antibiotika eingesetzt, so heißt das, dass die Stoffe direkt in das Wasser gegeben werden, wodurch alle Tiere gleichzeitig behandelt werden [47].

2.1.2.3 Anwendung im Pflanzenschutz

Auch im Obstbau kann bzw. konnte der Einsatz von Antibiotika erfolgen. Besonders beim Kernobst (Apfelanbau) gibt es eine bakteriell bedingte Pflanzenkrankheit, den Feuerbrand, durch den Triebe, Zweige und Blätter vertrocknen und wie verbrannt aussehen. Zusätzlich gibt es Triebdeformationen und die Abscheidung eines Sekretes, das über die Verbreitung durch Vögel, auch andere Zweige und Bäume infizieren kann [32]. Dringt der Erreger (*Erwinia amylovora*) bis in den Stamm vor, bedeutet das das Absterben des Baumes. Da auch tiefes Ausschneiden betroffener Pflanzenteile oder die Rodung von Plantagen die Krankheit nicht ausreichend eindämmen, und das vermehrte Auftreten manche Obstbauern in existenzbedrohende Lagen gebracht hat, ist man in der Vergangenheit dazu übergegangen, Streptomycin zur Bekämpfung einzusetzen [33]. Ursprünglich bestand zwar die Maxime, dass Antibiotika, die in der Humanmedizin eingesetzt werden (so auch Streptomycin), nicht bei Pflanzenkrankheiten verwendet werden sollten, aber aufgrund der großen Probleme erfolgte ab 1994 die Zulassung als Ausnahmeregelung. Ab März 2000 wurde dann die generelle Zulassung erteilt. Da aber die Untersuchung von Honigen Rückstandsgehalte über der festgesetzten Höchstmenge von 20 µg/kg erbrachte, da anscheinend auch Anteile des Wirkstoffes in die Obstblüte gelangen, wurde die Zulassung seit Beginn 2001 ruhen gelassen [34]. Zur Zeit wird der Wirkstoff nur in begrenzten Genehmigungsfällen zu Versuchszwecken angewendet, in denen das Rückstandsverhalten in Honigen geklärt werden soll [48]. Eine

routinemäßige Behandlung mit diesem Pflanzenschutzmittel in einer Befallssituation ist somit momentan nicht möglich.

2.2 Antibiotikaklassen

Die Antibiotika lassen sich in unterschiedliche Klassen aufgrund ihrer chemischen Struktur einteilen. Auch die Kategorisierung aufgrund ihres Syntheseweges, entweder natürlich durch Mikroorganismen, halbsynthetisch durch Modifizierung mikrobiologisch hergestellter Grundgerüste, oder rein chemisch ist eine weitere mögliche Vorgehensweise, jedoch nicht so üblich, wie die der chemischen Stoffklassen. Hier sollen die in der Verschreibung und Anwendung bedeutsamsten Klassen vorgestellt werden.

2.2.1 β -Lactamantibiotika

Ursprünglich aus dem Pilz *Penicillium notatum* gewonnen, leiten sich diese Substanzen in der Grundstruktur von der 6-Aminopenicillansäure und namensgebend von deren Untereinheit, dem viergliedrigen β -Lactamring ab. Natürlicher Herkunft, entstehen sie durch Biosynthese aus den Aminosäuren Cystein und Valin unter Bildung eines Thiazolidin- und des besagten β -Lactamringes [49]. Durch Variation der Seitengruppen an der 6-Amino-Position unterscheiden sich die einzelnen Wirkstoffe dieser Gruppe.

Eine Untereinteilung der Gruppe kann durch Unterscheidung in Penicilline, Aminopenicilline und Cephalosporine geschehen [37]. Die Aminopenicilline unterscheiden sich von den „normalen“ Penicillinen in einer Aminogruppe in α -Stellung zur Amidbindung des Restes an den β -Lactamring (siehe Abb. 1). Dies führt zu einer veränderten Wirksamkeit gegenüber Bakterien; wirken klassische Penicilline, wie Benzylpenicillin und Phenoxymethylpenicillin gegen grampositive Keime, so gelten Aminopenicilline, wie Amoxicillin und Ampicillin als Breitbandantibiotika, die zusätzlich gegen gramnegative Stäbchenbakterien wirken [1, 50]. Aufgrund dieser erweiterten Möglichkeit der Anwendung und etwa vergleichbaren Kosten für die Therapie ist auch ersichtlich, weshalb die Verschreibungshäufigkeit der Aminopenicilline weiter zunimmt, während jene der Penicilline abnimmt. Die Bedeutung der penicillinasefesten Penicilline (Flucloxacillin, Dicloxacillin), die den Abbau- und Schutzmechanismen der Bakterien besser entgegen können als die herkömmlichen, ist jedoch aufgrund hoher Therapiekosten von eher geringerer Bedeutung [37].

Die Cephalosporine haben statt der Verknüpfung eines Thiazolidinringes mit dem β -Lactamring einen sechsgliedrigen Dihydrothiazin-Ring. Auch sie lassen sich noch weiter differenzieren in β -Lactamase-resistente bzw. -sensitive Substanzen, sowie in oral- und parenteral-applizierte Vertreter. Ihr Wirkungsspektrum ist vergleichbar mit dem der Penicilline, zumal sie ja dem gleichen Grundtypus entsprechen. Bedeutsame Substanzen dieser Klasse sind Cefaclor, Cefuroximaxetil, Cefixim, die im Vergleich zu den Penicillinen aber deutlich höhere Therapiekosten verursachen.

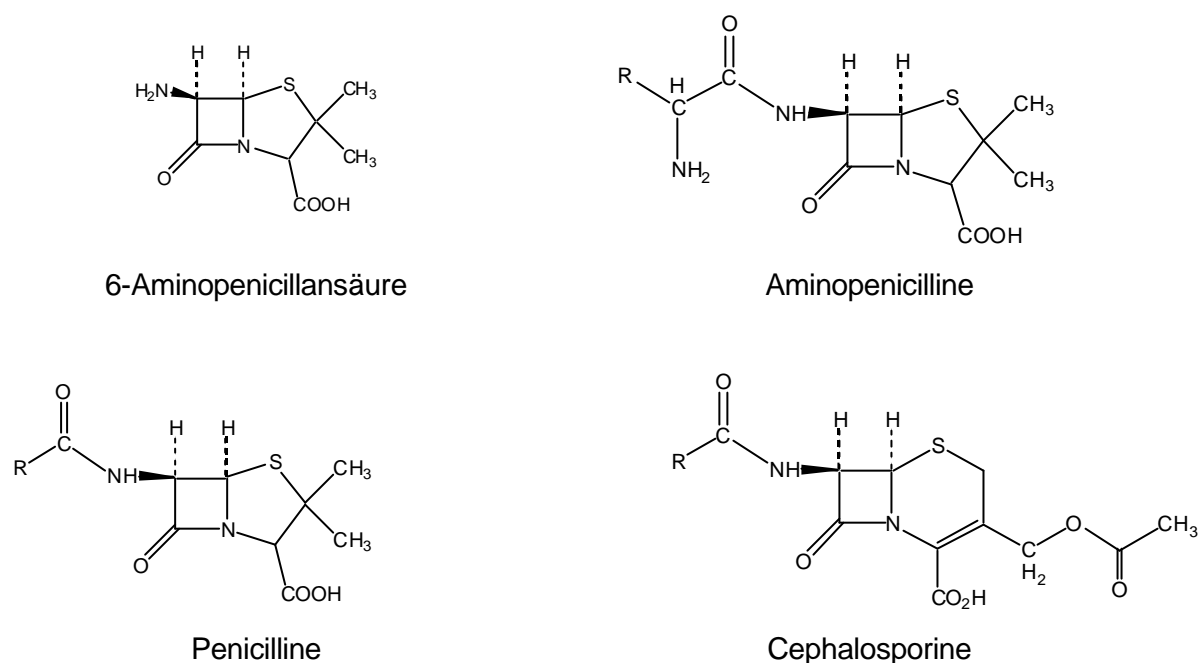


Abbildung 1: Grundstrukturen der β -Lactamantibiotika

Die Wirkung aller β -Lactamantibiotika beruht auf den gleichen molekularen Prinzipien. Ihr Einsatz geschieht zum Zeitpunkt der Zellteilung, während der Ausbildung der neuen Zellwand. Um die antibiotische Wirkung zu entfalten, müssen sie in der geschlossenkettigen Form vorliegen. Während des Zellteilungsprozesses ist das für die Ausbildung der neuen Zellwand notwendige Enzym Peptidoglycansynthetase (D-Alanin-Transpeptidase) aktiv und greift nucleophil an den Carbonyl-Kohlenstoff des β -Lactamrings an, öffnet dadurch den Ring und bindet kovalent das Penicillin, wodurch es zu einer Inaktivierung des Enzyms kommt. Dadurch kann in der Konsequenz das Mureingerüst zur Zellwandsynthese nicht vollständig ausgebildet werden. Es kommt nur zur unvollkommenen Quervernetzung des Gerüstes, so dass es durch den nicht-kompensierten Druck der Zelle zur Lysis kommt [49].

Da die antibiotische Wirkung der β -Lactamantibiotika nur in der geschlossenkettigen Form entfaltet werden kann, sind die Abwehrmechanismen der Bakterien vorwiegend darauf angelegt, den β -Lactamring der Penicilline zu öffnen, bevor eine Wirkung eintreten kann. Dies geschieht durch Katalyse mit Hilfe des Enzyms β -Lactamase. Dieses bindet zunächst kovalent den Wirkstoff, indem es, wie auch die Transpeptidase, am Carbonyl-Kohlenstoff nucleophil angreift und dadurch den Ring öffnet. Im folgenden Schritt wird die entstandene Esterbindung hydrolysiert, wodurch zum einen das Penicillin mit geöffnetem, hydrolysiertem und somit inaktivem Ring freigesetzt wird, und zum anderen die β -Lactamase wieder regeneriert und somit wieder aktiv ist [51]. Die genetische Information für die β -Lactamasen, die ursprünglich nur in einigen Pilzen und Bakterien gebildet wurden, kann chromosomal oder durch Plasmide von Bakterien zu Bakterien weitergegeben werden, so dass solche Resistenzen bei manchen Arten weit verbreitet sind.

Eine weitere Möglichkeit der Zielorganismen, die antibiotische Wirkung zu umgehen, besteht in der strukturellen Veränderung der Transpeptidasen, so dass diese nicht mehr an den β -Lactamring angreifen, oder in Zellmembranveränderungen, durch die das Eindringen der Wirkstoffe verhindert werden soll.

Strategien zur Umgehung von Resistenzmechanismen bestehen in der Entwicklung von Penicillinen, die β -lactamastabil sind und daher nicht hydrolysiert werden können, oder in der zusätzlichen Gabe von β -Lactamase-Inhibitoren (z.B. Clavulansäure), also Substanzen, die diese Enzyme blockieren, indem sie irreversibel an sie binden.

Die Resistenzsituation bzw. der Status der Verbreitung von Resistenzen ist sehr differenziert zu betrachten. Aufgrund der großen Unterschiede in den Lebensräumen der Bakterien, gibt es auch Unterschiede betreffend Häufigkeit, Spektrum und Konzentrationen von Antibiotika, denen Mikroorganismen ausgesetzt sind. Sehr unterschiedlich ist auch die Reaktion der Bakterienarten und -familien. Daher können hier nur beispielhaft prozentuale Angaben für Resistenzen in manchen Arten und in bestimmten Matrices, aus denen sie isoliert wurden, gemacht werden: Gegen Ampicillin wurden in klinischen Isolaten von *Escherichia coli* 36 % resistente gefunden, von *Klebsiella pneumoniae* 73 %, von *Enterococcus faecium* 49 %, von *Enterococcus faecalis* 0,5 %. Gegen das Cephalosporin Cefazolin z.B. 6 % resistente *E. coli*, 84 % bei *Enterobacter cloacae*. Gegen Penicillin G waren beispielsweise 80 % der untersuchten *Staphylococcus aureus* Stämme resistent und 84 % der coagulasenegativen

Staphylokokken [9]. In Isolaten aus Klärwerken waren von 15 isolierten Stämmen (v.a. *Aeromonas hydrophila*) über 90 % resistent gegen Amoxicillin und 50 % gegen Cefaclor [8].

2.2.2 Tetracycline

Wie auch die Penicilline wurden die ersten Tetracycline aus natürlich vorkommenden Arten gewonnen. Statt eines Pilzes als Produzent, waren es im Falle der Tetracycline verschiedene Streptomyces-Arten [2, 52], also Bakterien aus der Klasse der Actinomyceten. Selbst grampositiv, wirken auch die von ihnen produzierten Tetracycline auf grampositive, aber auch auf zahlreiche gramnegative Keime.

Ihre Struktur basiert auf einem Naphthacen-Grundgerüst, wobei sich die einzelnen Tetracycline durch unterschiedliche Substituenten an diesem Vierer-Ring ergeben (siehe Abb. 2). 1948 isolierte Duggar Chlortetracyclin als ersten Vertreter dieser Gruppe; heutzutage geschieht die Herstellung durch Fermentation in Submerskulturen, bzw. durch Partialsynthese (weitere chemische Veränderung) der fermentativ gewonnenen Substanzen.

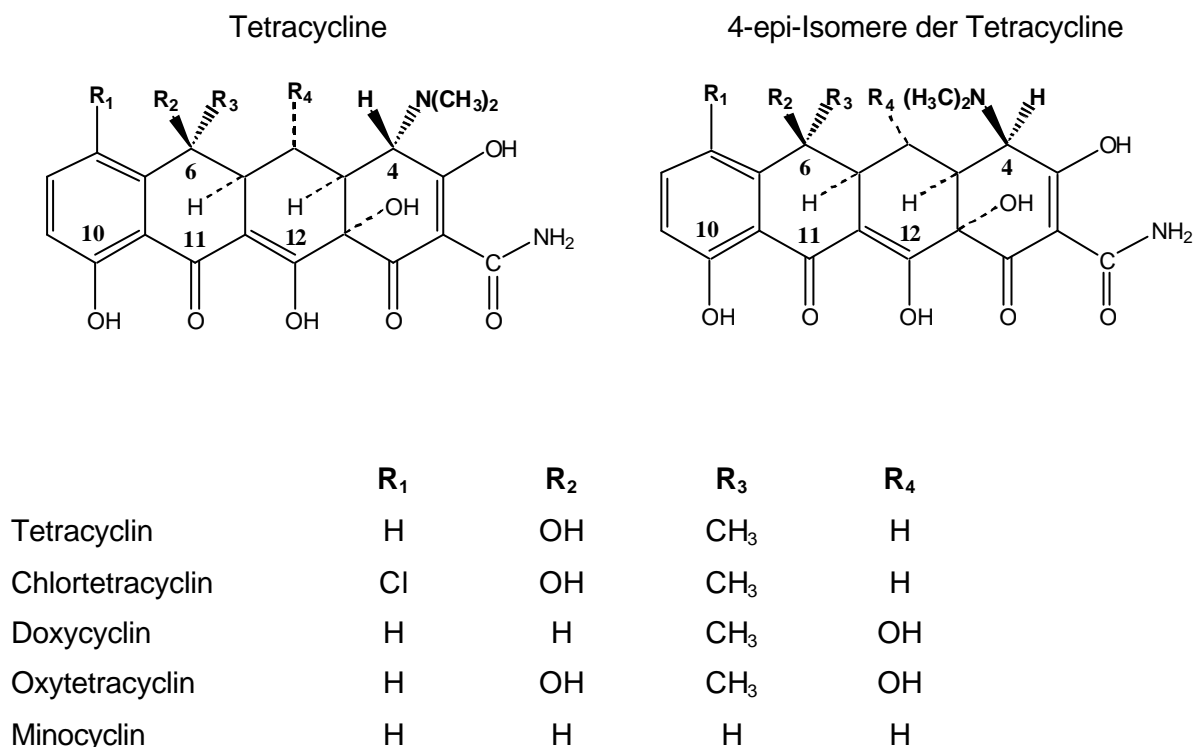


Abbildung 2: *Strukturen von Tetracyclinen und den zugehörigen 4-Epimeren*

Die bedeutsamsten Vertreter dieser Klasse sind Tetracyclin (TCY), Doxycyclin (DCY), Chlortetracyclin (CTC), Minocyclin (MCY), Oxytetracyclin (OTC). Davon werden in der Humanmedizin vor allem Doxycyclin und Minocyclin angewendet, in der Tiermedizin hingegen Chlortetracyclin und Oxytetracyclin. Die Therapiekosten sind in der Humananwendung extrem gering und mit DDD-Kosten von 0,2-0,3 € für Doxycyclinpräparate mit ein Grund für die Verschreibungshäufigkeit.

Zusätzlich zu der Anwendung im Fall einer bakteriellen Infektion werden Tetracycline, nämlich Minocyclin und Tetracyclin, auch zur Aknebehandlung eingesetzt, wobei ersteres oral appliziert wird, Tetracyclin aber topisch als Salbe aufgetragen wird. Die „normale“ Infektionsbehandlung ist jedoch das weitaus größere Anwendungsgebiet mit zehnmal so vielen verschriebenen DDD.

Die Wirkung der Tetracycline beruht auf der Hemmung der Proteinbiosynthese (bakteriostatisch). Nach Eindringen in die Bakterienzelle binden sie an der 30 S Untereinheit des 70 S Ribosoms. Dadurch wird verhindert, dass die Aminoacyl-tRNA an die Akzeptor-Seite des mRNA-Ribosomenkomplexes binden kann. Als Folge ist die Elongationsphase der Proteinsynthese unterbrochen und Polypeptidstücke, statt vollständiger Proteine, bleiben zurück [53].

Es existieren jedoch Resistenz-Mechanismen, die die Wirkung der Tetracycline mindern oder umgehen können. Bei einer Möglichkeit wird die Bindungsstelle am Ribosom so verändert, dass Tetracycline dort nicht mehr binden können, die Proteinbiosynthese also ungestört ablaufen kann. Eine zweite Möglichkeit ist der aktive Transport der Wirkstoffe aus der Zelle (aktive Membranpumpe), um die Konzentration zu verringern und somit auch die Hemmwirkung zu senken. Da diese Arten der Resistenz recht einfach durch Transformation, Transduktion oder Konjugation von einer Bakterienzelle an eine andere weitergegeben werden können, sind auch Resistenzen gegen Tetracycline recht weit verbreitet [1].

Von 12 Isolaten von Keimen aus Krankenhausabwässern waren mehr als 90 % resistent gegen Doxycyclin; in 15 Isolaten (davon 8 *Aeromonas*-Arten) aus Kläranlagenwässern waren 40 % resistent gegen den gleichen Wirkstoff. Da Kreuzresistenzen² innerhalb der Gruppe der Tetracycline recht häufig sind, ist zu vermuten, dass also nicht nur gegen Doxycyclin, sondern auch gegen Chlortetracyclin oder Tetracyclin Resistenz besteht [8].

² Kreuzresistenz: Die Resistenz gegen einen Wirkstoff kann gleichzeitig auch die Resistenz gegen einen anderen Stoff bedeuten. Häufig bei Substanzen mit ähnlicher Struktur, also innerhalb der gleichen Antibiotikaklasse.

Des Weiteren waren klinische Isolate von *Proteus mirabilis* zu 96 % resistent gegen DCY, von *Enterobacter cloacae* hingegen nur 6 %. Bei *Enterococcus faecalis* wiesen 62 %, und bei *Enterococcus faecium* 59 % Resistenzen gegen DCY auf [9]. Die Untersuchung von Akne-Patienten ergab, dass bei 53 % der Behandelten (38 der 72 Personen) aus Hautabtupfungen Propionibakterien (*Propionibacterium acnes* und *P. granulosum*) nachgewiesen werden konnten, die resistent gegen Tetracyclin waren. Zu bemerken ist hier, dass bei 51 der 72 Patienten zuvor oral und/oder topisch Tetracyclin in ihrer Behandlung angewandt worden ist [38].

2.2.3 Makrolide

Die Makrolid-Antibiotika sind makrocyclische Verbindungen, die sich von einem vielgliedrigen (12-17) Lacton-Ring (innerer Ester) ableiten, welcher mit 1-3 seltenen Zuckern (auch Aminozucker) glycosidisch verknüpft ist. Wie die Tetracycline werden auch sie natürlicherweise gewonnen, bzw. durch Partialsynthese aus biosynthetisch hergestellten Grundstrukturen verändert. Neben der Möglichkeit der Gewinnung aus *Streptomyces*-Kulturen (Erythromycin erstmalig 1952 aus *Streptomyces erythreus* von McGuire isoliert [54]), besteht heutzutage auch die Möglichkeit der Vollsynthese.

Sie wirken vor allem gegen grampositive Keime, da diese Makrolide um einen Faktor von bis zu 100 besser in sich aufnehmen können, als gramnegative. Grund ist die äußere Membran, durch die das Eindringen in die Zelle der gramnegativen Erreger erschwert wird. Es gibt aber auch gramnegative Vertreter, die in ihrem Wachstum gehemmt werden können (*Haemophilus*, *Neisseria*, *Legionella*, *Campylobacter*) [50].

Die wichtigsten Makrolide sind, bezogen auf ihre Anwendungshäufigkeit, Roxithromycin (ROX), Erythromycin (ERY), Clarithromycin (CLA), Tylosin (im Veterinärbereich) (siehe Abb. 3). Die Therapiekosten sind dabei recht unterschiedlich; während Erythromycin-Präparate recht kostengünstig sind (meist unter 2 €DDD) liegen Roxithromycin-Präparate bei 2,50 €DDD im Durchschnitt und Clarithromycin bei 4-5 €DDD, was unter anderem auch daran liegen mag, dass ROX und CLA erst durch Partialsynthese aus ERY hergestellt werden [2, 37].

Makrolide werden häufig bei Infektionen der Atemwege, des Hals-Nasen-Ohrenbereiches und bei bakteriellen Entzündungen der Haut und der ableitenden Harnwege angewendet. Unter den Antibiotika, die gegen Akne angewendet werden, ist ERY das häufigste. Hierbei liegen

die DDD-Kosten mit etwa 0,50 € unter denen von Präparaten mit anderen Wirkstoffen (z.B. Tetracyclin, Clindamycin).

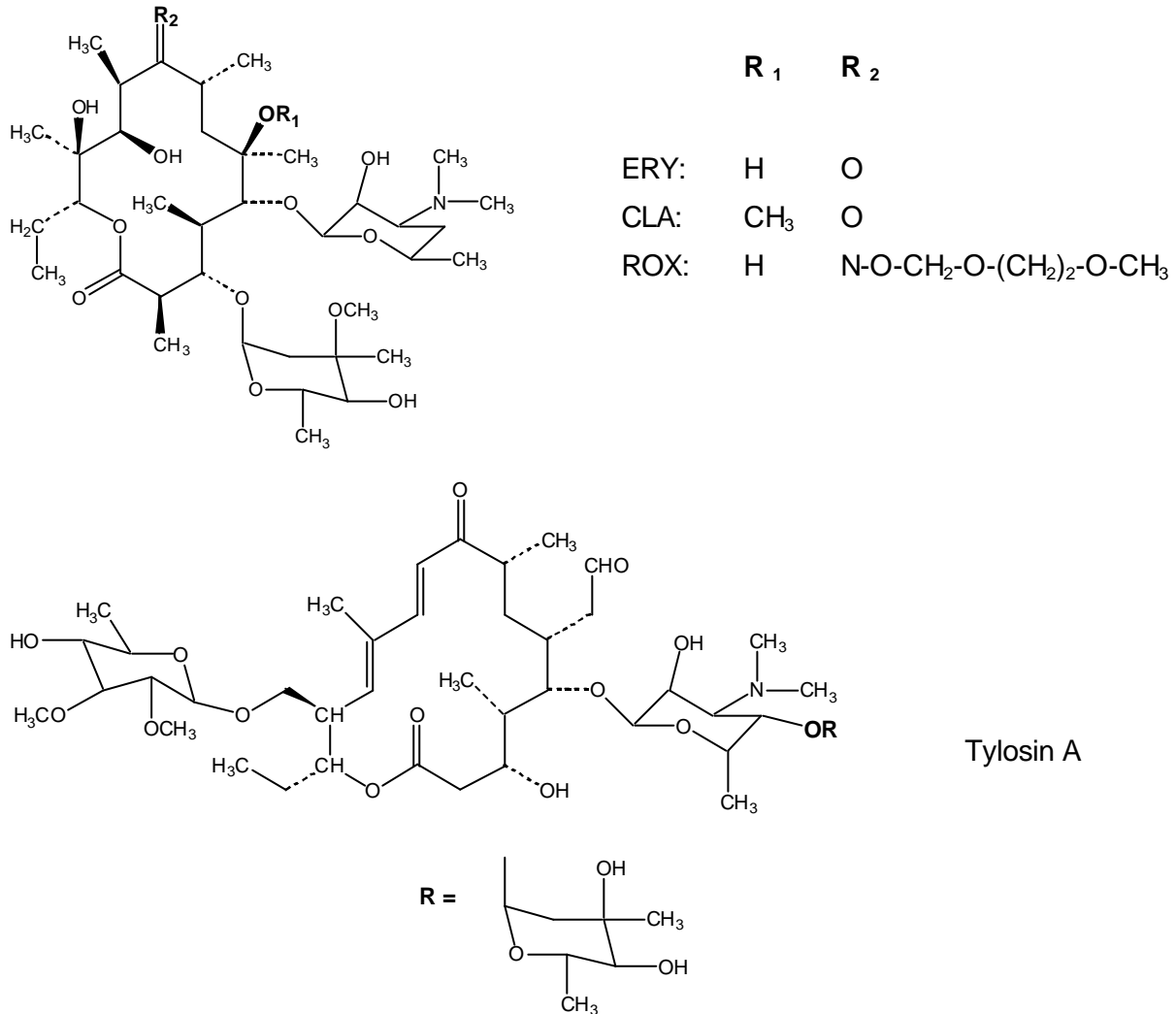


Abbildung 3: *Strukturen verschiedener Makrolide*

Die bakteriostatische Wirkung der Makrolide beruht auf einer Hemmung der Proteinbiosynthese. Dazu binden sie an der 50 S Untereinheit der 70 S Ribosomen und blockieren dort die Translokation, während der die Peptidyl-tRNA von der Akzeptor- auf die Donorstelle übertragen wird. Die Elongation des Peptidstranges wird unterbrochen und die Proteinsynthese nicht zum Ende gebracht, was im Endeffekt eine bakteriostatische Wirkung zur Folge hat [1].

Resistenzmöglichkeiten der Bakterien gegen Makrolide gibt es vielerlei. Eine beruht darauf, die Aufnahme in die Bakterienzelle zu verhindern oder zu reduzieren. Da die Aufnahme im Wesentlichen auf passiver Diffusion beruht, kann eine Gegenmaßnahme darin bestehen, die Substanzen aktiv aus der Zelle auszuschleusen. Des Weiteren kann die Zielstruktur an der 50 S Untereinheit so verändert werden, dass ein Andocken der Makrolide nicht mehr geschehen kann und die Proteinsynthese ihren gewohnten Gang geht. Eine dritte Möglichkeit besteht darin, die Makrolide mit Hilfe enzymatischer Vorgänge zu inaktivieren [50].

Hier, wie auch bei den Tetracyclinen, existieren oft chromosomale Kreuzresistenzen innerhalb der Makrolid-Gruppe. Klinische Isolate von *Enterococcus faecium* und von *E. faecalis* waren zu 59 % bzw. 32 % resistent gegen Erythromycin; Coagulase-negative Staphylokokken und *Staphylococcus aureus* zu 53 % bzw. 17 %.

Hautabtupfungen von 72 Aknepatienten ergaben bei 68 (94,4 %) Personen, dass die in den Abstrichen vorhandenen Propionibakterien resistent gegen Erythromycin waren. Lediglich bei 4 Personen waren diese Keime noch sensibel gegen den Wirkstoff. Von den 72 Patienten waren nachweislich 62 zuvor oral und/oder topisch mit Erythromycin behandelt worden. Vor allem die topische Anwendung dieses Makrolids steht im Verdacht, die Ausbildung von Resistenzen zu unterstützen [38]. Zu beachten ist, dass bei der topischen Aknetherapie die Substanzen über eine deutlich längere Zeit angewendet werden, als dies bei der üblichen Therapie einer Infektion der Fall ist. So dauert die Behandlung oft mehrere Wochen, im Gegensatz zu 3-10 Tagen. Mit Zunahme der Behandlungsdauer nimmt auch die Wahrscheinlichkeit der Resistenzentwicklung zu, da die Bakterien, sofern sie nicht vollständig abgetötet worden sind, deutlich mehr Zeit haben, sich den veränderten Lebensbedingungen anzupassen und Überlebensmechanismen zu entwickeln. Daher sollte die Gabe von Antibiotika im allgemeinen nur über kurze Zeit, dafür aber mit ausreichend hohen Konzentrationen geschehen, was sie für die Aknebehandlung nicht so sehr auszeichnet.

Um Akne dennoch mit Makroliden zu behandeln und einer ausgeprägten Resistenzentwicklung vorzubeugen, besteht die Möglichkeit der gleichzeitigen Gabe von Schälmitteln, wie Benzoylperoxid (Antiresistenzmittel), Tretinoin oder Isotretinoin, was auch zu besseren Wirksamkeiten führt.

2.2.4 Sulfonamide und Trimethoprim

Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Antibiotikaklassen sind die Sulfonamide nicht natürlichen Ursprungs, sondern synthetisch hergestellt. Daher werden sie auch als Chemotherapeutika bezeichnet. Sie leiten sich vom Sulfanilamid ab, das erstmalig 1908 synthetisiert wurde und dessen antibiotische Wirkung 1932 von Domagk erkannt wurde [49]. Die Wirksamkeit beruht auf der p-Aminobenzolsulfonsäuregruppe, weshalb ausgehend vom Sulfanilamid viele Tausend verschiedene Verbindungen hergestellt worden sind, die antibiotisch wirksam sind und von denen etwa 30 in Arzneimitteln verwendet werden.

Das Wirkspektrum besteht aus grampositiven und gramnegativen Kokken (Streptokokken, Pneumokokken, Meningokokken), *Actinomycetes*, *Nocardia*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, und anderen.

Auch in diese Gruppe der Chemotherapeutika zählt Trimethoprim, welches meist gleichzeitig in Kombinationspräparaten gegeben wird, da es im Verhältnis 1:5 besonders synergistische Wirkung zeigt. Es leitet sich in der Struktur hingegen nicht vom Sulfanilamid ab, sondern besteht aus einem Diaminobenzylpyrimidin (siehe Abb. 4) [50].

Die bekanntesten und wichtigsten Vertreter dieser Klasse sind Sulfamethoxazol (nur im Humanbereich), Sulfamerazin, Sulfadiazin, Sulfadimidin (Veterinäranwendung). Es sind relativ kostengünstige Medikamente. Die Therapiekosten liegen zwischen ca. 0,3 und 0,5 €DDD bei Cotrimoxazol[®]-Präparaten³.

Oral appliziert, werden sie bei Harnwegsinfektionen, Infektionen der oberen und unteren Luftwege, der Atemwege, Infektionen im Hals-Nasen-Ohren-Bereich, des Magen-Darm-Traktes, und anderen angewandt. Zusätzlich wird Sulfadiazin auch in Dermatika als Creme topisch aufgetragen zur Wundbehandlung nach Verbrennungen und anderen Schädigungen der Haut [36]. Sulfadimidin ist in der Veterinärmedizin sehr weit verbreitet zur Behandlung von Infektionen aller Art, vor allem mit oraler Applikation, aber auch als Salbe zum Auftragen auf infizierte Wunden [40].

³ Cotrimoxazol[®]

Kombinationspräparat aus Sulfamethoxazol und Trimethoprim im Verhältnis 5:1 Sulfamethoxazol wird in Deutschland nur in dieser Kombination als Arzneimittel angewendet.

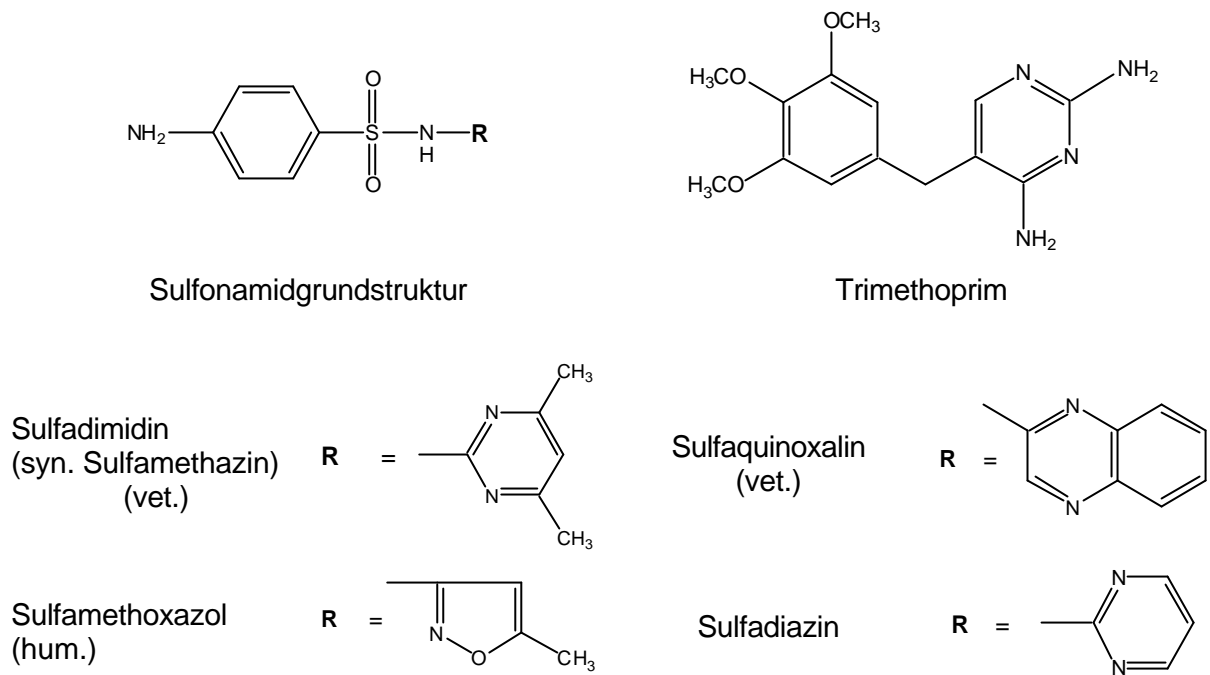


Abbildung 4: Strukturen von Sulfonamiden und Trimethoprim

Die Wirkung der Sulfonamide ist bakteriostatisch. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zur p-Aminobenzoesäure (p-ABS) greifen die Sulfonamide in die bakteriellen Synthesewege der Folsäure ein. Sie gelten daher als Antimetabolit und binden anstatt der p-ABS an die Dihydropterinsäure-Synthetase. Dadurch kann Hydropterinsäure als Vorstufe der Dihydrofolsäure nicht mehr gebildet werden. Dihydrofolsäure (DHF) wird aber von den Bakterien benötigt, um nach Reduktion daraus Tetrahydrofolsäure (THF) zu synthetisieren, die zur DNA und RNA-Synthese und somit auch für die Proteinsynthese benötigt wird [1].

Dieser Effekt der Sulfonamide würde auch in den Humanstoffwechsel eingreifen, doch den menschlichen Körper trifft diese Wirkung nicht, da er Folsäure nicht synthetisieren kann und daher als Vitamin aus der Nahrung aufnehmen muss. Bakterien hingegen können Folsäure nicht von außen aufnehmen und werden so nach einer gewissen Zeit gehemmt. Bevor es zur Wachstumshemmung kommt, wird zunächst noch vorhandene Folsäure aufgebraucht, erst dann wird die Konkurrenz (kompetitive Hemmung) zwischen p-ABS und den Sulfonamiden sichtbar. Da es sich tatsächlich um eine Konkurrenz und Verdrängung an den Bindungsstellen des Enzyms handelt, muss auch die Konzentration an Sulfonamiden groß genug sein. Wäre nämlich mehr p-ABS vorhanden, so würden dadurch eher die Sulfonamide verdrängt werden.

Dieser Eingriff in den Folsäure-Metabolismus kann zusätzlich durch die Gabe von Trimethoprim (TRI), als Synergist, verstärkt werden. TRI ist ein Hemmstoff der

Dihydrofolsäurerduktase, durch die DHF zu THF reduziert wird. Durch die kombinierte Gabe von Sulfonamiden mit TRI wird also die Folsäuresynthese an zwei unterschiedlichen Stellen, und somit recht effektiv, unterbrochen.

Obwohl Säugerzellen selbst nicht DHF synthetisieren können, besitzen sie dennoch die Dihydrofolsäurerduktase, um aufgenommene DHF in die aktive THF zu reduzieren. Hier könnte Trimethoprim hemmend eingreifen, da aber die Affinität zur bakteriellen DHF-Reduktase 52.000 mal höher ist als zur DHF-Reduktase des Menschen, stellt die Gabe für den menschlichen Organismus kein Problem dar.

Durch Resistenzmechanismen kann auf verschiedene Weise die Wirkung der Sulfonamide und des Synergisten abgeschwächt werden: Zum einen kann die Bindungsstelle der Dihydropteroinsäuresynthetase so verändert werden, dass eine niedrigere Affinität für Sulfonamide resultiert und p-ABS vermehrt gebunden wird. Des Weiteren kann in der Bakterienzelle die Produktion von p-ABS erhöht werden, so dass die Konkurrenz durch Sulfonamide kompensiert werden kann. Außerdem können Mechanismen zur Inaktivierung von Sulfonamiden entwickelt werden, so dass eine verstärkte Metabolisierung der Substanzen erfolgt.

Auch die Ausbildung von Resistenzen gegen Trimethoprim kann auf der Veränderung der Bindungsstelle des betreffenden Enzyms beruhen. Eine andere Möglichkeit die Wirkung des Synergisten zu reduzieren, besteht in der vermehrten Produktion des Enzyms, durch die die vorhandene Konzentration an Trimethoprim kompensiert werden soll [50].

Resistenzen gegen Sulfonamide treten recht häufig auf, zumal, wenn Sulfonamide nicht in Kombination mit TRI, sondern als Einzelsubstanzen angewandt werden. Gegen Cotrimoxazol waren in klinischen Isolaten z.B. von *Escherichia coli* 23 %, von *Enterobacter cloacae* 19 %, von *Klebsiella pneumoniae* 10 % und von Coagulase-negativen Staphylokokken 30 % resistent [9]. In Krankenhausabwässern waren von 12 Isolaten 50 % resistent gegen SMX/TRI; in 15 Isolaten aus kommunalen Abwässern waren 40 % resistent [8].

Generell gilt auch hier, dass besonders die Anwendung in zu niedrig gewählten Konzentrationen oder aber die Gabe über einen langen Zeitraum das Auftreten von Resistenzen begünstigen. Die kombinierte Gabe von Sulfonamiden und TRI kann aufgrund der Doppelblockade und der damit verbundenen stärkeren Wirkung, viel stärker die Bakterien hemmen und so die Resistenzentwicklung verzögern.

2.2.5 Gyrasehemmer/Fluorochinolone

Auch die Gyrasehemmer/Fluorochinolone sind, wie die Sulfonamide, synthetisch hergestellte Substanzen, und werden daher zusammen mit ihnen als Chemotherapeutika bezeichnet, da sich in der Natur keine Vorbilder finden lassen. Von der Grundstruktur her haben sie ein Chinolingerüst und leiten sich von der 4-Oxochinolin-3-carbonsäure ab (siehe Abb. 5) [2]. Erstmals wurde 1962 mit Nalixidinsäure ein Vertreter dieser Gruppe angewandt. Seitdem hat sich diese Gruppe unter anderem durch die Einführung eines Fluoratoms weiterentwickelt, besonders was das Wirkungsspektrum angeht. Das besondere an dieser Gruppe ist der Wirkungsmechanismus, der im Gegensatz zu den anderen Antibiotikaklassen einen neuen Ansatz verfolgt, nämlich die Hemmung der Gyrase.

Die Fluorochinolone wirken bakterizid und haben ein breites Wirkungsspektrum gegen grampositive und gramnegative Keime. Sie können auch noch gegen Bakterien wirken, die aufgrund von Multiresistenzen⁴ nicht mehr sensibel gegenüber vielen anderen Antibiotikaklassen sind (Reserveantibiotikum⁵) [50].

Die wichtigsten Vertreter dieser Klasse sind Ciprofloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Norfloxacin, Enrofloxacin (Veterinärbereich). Letzteres kann durch Abspaltung der Ethylgruppe am Piperazinyling zu Ciprofloxacin abgebaut werden (siehe Abb. 5).

Eingesetzt werden die Fluorochinolone bei Atemwegsinfektionen, bei bakteriellen Darmerkrankungen, bei Harnwegsinfektionen, Infektionen des Hals-Nasen-Ohrenbereiches, Lungenentzündungen, Infektionen des Genitalbereiches und auch bei Infektionen der Knochen. Das im Veterinärbereich zugelassene Enrofloxacin wird ebenfalls bei einer Vielzahl von Infektionen (Respirations-, Digestionstrakt, bakterielle Sekundärinfektionen, Mischinfektionen, etc.) bei Kälbern, Ferkeln, Schweinen, Puten, Hühnern, u.a. angewandt [40].

Die Applikation erfolgt oral, mit Ausnahme der Anwendung in Salben und Tropfen als Ophthalmika (Augenmittel). Preislich liegen die Präparate deutlich über den meisten anderen Antibiotika. Betragen die DDD-Kosten bei Norfloxacin-Mitteln noch moderate 2 € so liegen Ciprofloxacin-Medikamente bei über 8 €DDD.

⁴ Multiresistenz: Resistenz gegen mehrere Antibiotika aus verschiedenen Klassen, und mit unterschiedlichen Wirkmechanismen; z.B. Penicilline und Tetracycline

⁵ Reserveantibiotikum: Antibiotikum, das nur in den Fällen eingesetzt wird, in denen andere Mittel aufgrund von Resistenzen versagen. Werden zumeist nicht routinemäßig, sondern in Ausnahmefällen angewandt

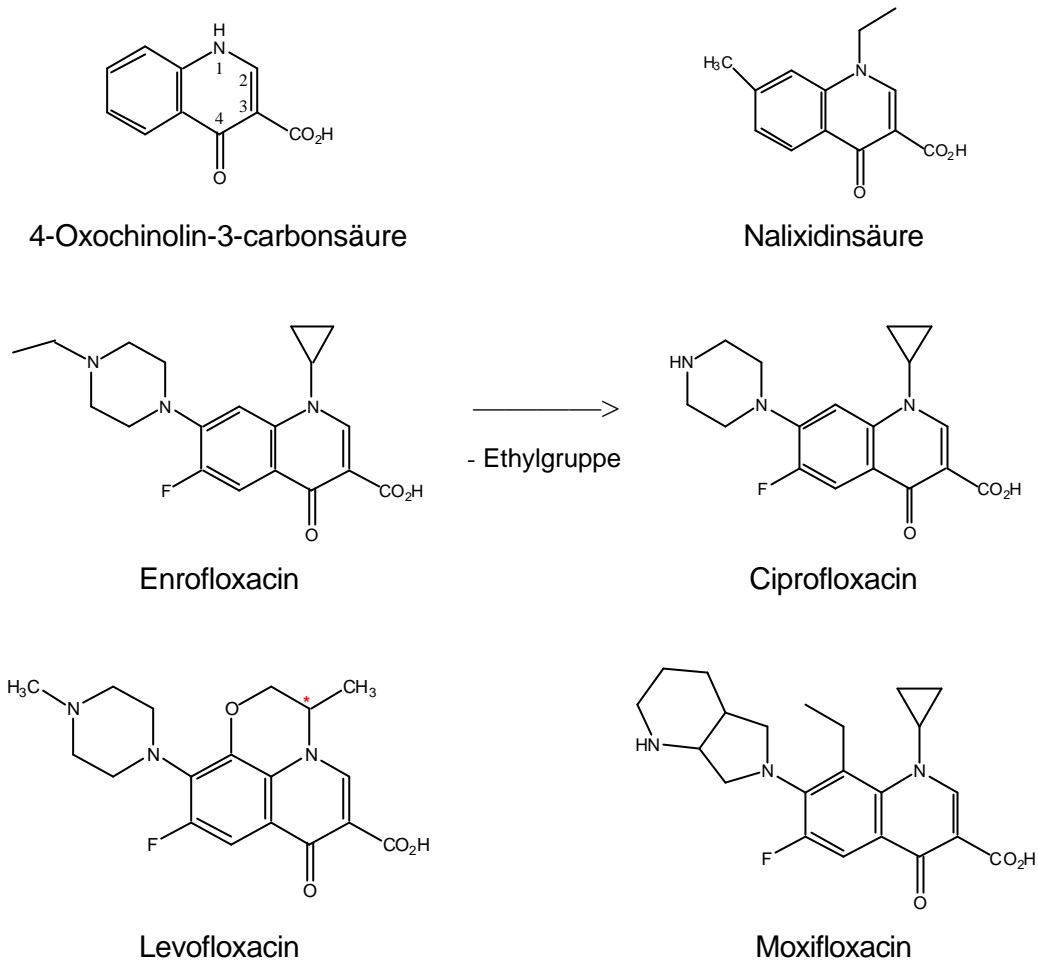


Abbildung 5: Strukturen von Gyrasehemmern/Fluorochinolonen

Fluorochinolone wirken bakterizid, indem sie die bakterielle DNA-Gyrase (genauer Topoisomerase II) hemmen. Die Gyrase ist für die Bakterienzelle lebenswichtig, um die DNA in die richtige Form zu bringen, d.h. sie faltet und verdrillt die DNA (Supercoiling), so dass sie platzsparend in die Zelle passt. Aber nicht nur die Unterbringung in die Zelle wird dadurch gewährleistet, sondern auch normale Vorgänge wie Replikation, Transkription oder Reparatur der DNA. Funktioniert die Gyrase nicht mehr einwandfrei, so treten eine Reihe von Fehlfunktionen auf, die in der Konsequenz den Tod der Zelle bedeuten. Die Fluorochinolone binden an die Gyrase und bilden stabile Komplexe, so dass die Verdrillung der DNA nicht mehr stattfinden kann [1].

Dachte man zunächst, dass es kaum zur Ausbildung von Resistenzmechanismen gegen Fluorochinolone kommen würde, so musste man feststellen, dass die bakterielle Evolution doch zu verschiedenen Möglichkeiten geführt hat. Eine beruht auf der Veränderung der

Bindungsstelle an der Topoisomerase II, eine andere auf der aktiven Ausschleusung der störenden Substanzen aus der Zelle. Mitunter sind diese Resistenzen sehr stark verbreitet, z.B. waren klinische Isolate von *Enterococcus faecium* zu 73 % resistent gegen Ciprofloxacin und zu 85 % gegen Ofloxacin, bei den Coagulase-negativen Staphylokokken waren es jeweils 45 %. Dagegen zeigten Isolate von *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* und *K. oxytoca* Resistenzen gegen Ciprofloxacin und Ofloxacin nur zu 5 % und weniger [38]. Isolate aus Krankenhausabwässern zeigten bei einem Spektrum von 12 verschiedenen Keimen zu knapp 30 % Resistenz gegen Ciprofloxacin, in Kläranlagenabläufen (13 Isolate) waren es jedoch weniger als 5 % [8].

2.2.6 Lincosamide

Lincosamide werden sowohl mit Hilfe von Kulturen aus *Streptomyces lincolnensis* gewonnen (Lincomycin, erstmals 1962 isoliert), als auch durch partialsynthetische Veränderung dieses biosynthetisch hergestellten Antibiotikums [2]. Aufgrund nur geringfügiger chemischer Variation konnte mit dem Wirkstoff Clindamycin ein halbsynthetisches Derivat hergestellt werden, das über eine 2-10fach höhere Wirksamkeit verfügt, als sein natürliches Pendant.

In der Struktur leiten sie sich von einem substituierten Pyrrolidinring und einem Octopyranosid-Ring ab, die über eine Amidbindung miteinander verknüpft sind (siehe Abb. 6). Sie werden meist zusammen mit den Makroliden genannt, weniger aufgrund der chemischen Struktur, die doch sehr verschieden ist, als vielmehr wegen der Wirkweise und des Wirkungsspektrum. Auch die Lincosamide wirken gegen grampositive Kokken, sowie gegen gramnegative Anaerobierarten, nicht aber gegen Enterokokken und aerobe gramnegative Bakterien [50].

Sie kommen daher zum Einsatz bei Infektionen der tiefen Atemwege, des Bauch- und Beckenraumes, bei Infektionen der Knochen und Gelenke, bei bakteriellen Infektionen des Hals-Nasen-Ohrenbereiches, bei Infektionen im Zahn- und Kieferbereich, sowie bei Infektionen des weiblichen Geschlechtsbereiches. Dabei erfolgt die Applikation oral mit einer Verfügbarkeit von 70-90 % des Wirkstoffes [1]. Außerdem wird Clindamycin, wie Erythromycin auch, in Dermatika zur Behandlung von Hautinfektionen und bei Akne topisch, als Cremes, in Gelen oder Lösungen verwendet [36].

Aufgrund der geringeren Wirksamkeit wird Lincomycin heutzutage in der Humananwendung nur selten verabreicht, hier hat Clindamycin einen wesentlich höheren Stellenwert, so dass es in 2002 mit 5,8 Mio verordneten DDD im Anwendungsbereich der normalen Infektionen nur

etwas seltener als das Makrolid Erythromycin (9,0 Mio. DDD) verschrieben worden ist [37]. In der Behandlung von Akne und von anderen Hautkrankheiten ist die Verwendung von Clindamycin deutlich seltener als die von Erythromycin (von Lincomycin gibt es kein Präparat). Die Therapiekosten sind bei diesen Mitteln mit 1 €DDD etwa doppelt so hoch wie vergleichbare ERY-Präparate. Die Kosten der oral applizierten Mittel betragen hingegen sogar ca. 5 €DDD, im Gegensatz zu durchschnittlich 2 €DDD für Medikamente auf ERY-Basis.

Anders sieht die Situation im Veterinärbereich aus. Dort wird Clindamycin lediglich in einem einzigen Präparat für Hunde eingesetzt [40]. Den Hauptteil der Lincosamide macht hier Lincomycin aus, welches in vielen Präparaten für Hunde und Katzen, aber auch für Nutztiere wie v.a. Schweine, Kälber und Hühner, oft in Verbindung mit Spectinomycin (mit den Aminoglycosiden verwandt), zur Behandlung verschiedener Erkrankungen der Atemwege, des Magen-Darmtraktes oder von Gelenkentzündungen eingesetzt wird.

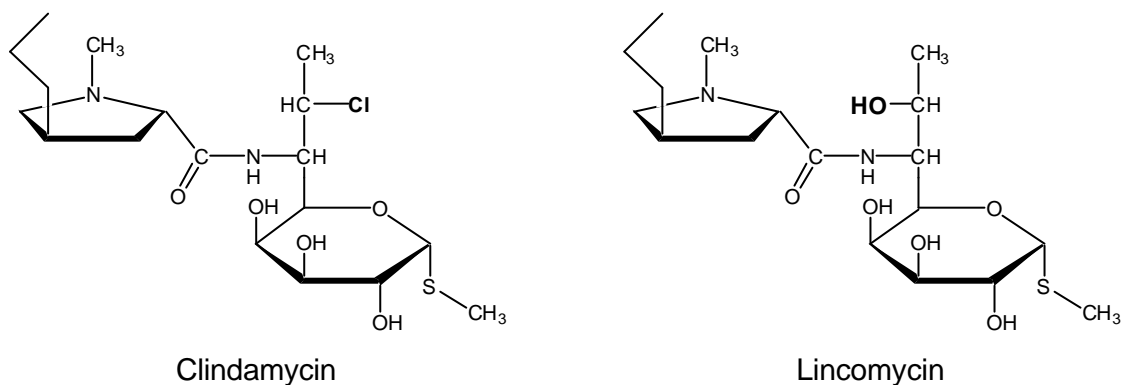


Abbildung 6: *Strukturen von Clindamycin und Lincomycin*

Lincosamide haben bakteriostatische Wirkung. Sie wirken, ähnlich wie die Makrolide, während der Proteinbiosynthese. Dazu binden sie an die 50S Untereinheit der Ribosomen genau im aktiven Zentrum. Hierdurch wird die Reaktion der Aminoacyl-tRNA mit dem Peptidyltransferasezentrum blockiert, und es kann nicht zur weiteren Elongation der Peptidkette kommen; die Proteinsynthese ist unterbrochen [1].

Die Hilfsmechanismen der Bakterien, diese antibiotische Wirkung zu umgehen, beruhen auf ähnlichen Prinzipien wie bei den Makroliden: So können Störsubstanzen in den Zellen, durch Abbau oder durch Metabolisierung, enzymatisch inaktiviert werden. Ein anderer Weg ist die

aktive Ausschleusung aus der Zelle, um die Konzentration zu erniedrigen. Die Veränderung der Zielstrukturen (Mutation der RNA), also des aktiven Zentrums in der 50S Untereinheit, so dass eine Anbindung der Antibiotika daran nicht mehr geschehen kann, ist eine dritte Möglichkeit.

Da diese Mechanismen sowohl bei den Makroliden, als auch bei den Lincosamiden sehr ähnlich sind, sind Kreuzresistenzen gegen diese beiden Gruppen weit verbreitet. Vielfach beruhend auf Punktmutationen der RNA, unterscheidet sich das Kreuzresistenzverhalten von der Stelle der Punktmutation. Geschieht eine Mutation an einem Basenpaar, so kann das eine etwa gleichstarke Kreuzresistenz bzgl. Erythromycin und Clindamycin beinhalten. Ist jedoch das nächste Basenpaar verändert, so kann das schon bedeuten, dass Resistenz gegen ERY besteht, aber keine gegen CLI [38].

Resistenzen gegen Clindamycin traten in klinischen Isolaten von coagulase negativen Staphylokokken zu 28 % auf, bei *Staphylococcus aureus* zu 8 % [9]. Besonders die Behandlung von Akne, per topischer Applikation, führt vermutlich zu erhöhtem Auftreten von Resistenzen. So konnte in Untersuchungen der Hautabtupfungen von 72 Patienten und Isolation der darin vorkommenden Propionibakterien, gefunden werden, dass bei 65 Patienten (90 %) gegen CLI resistente Keime vorkamen. Dabei hatten von den 72 nur 17 Patienten CLI-haltige Mittel in der Zeit zuvor angewendet, aber 62 ERY (manche hatten also mehrere Medikamente verwendet), was auf die verbreitete Kreuzresistenz zwischen Makroliden und Lincosamiden hindeutet. Von den CLI-resistenten Propionibakterien (also von 65 Patienten (90%)) waren nur Isolate von 32 Patienten gleichzeitig resistent gegen CLI und ERY [38]. Bei manchen Bakterien kann also die Anwendung eines Mittels bedeuten, dass nicht gegen dieses Mittel Resistenzen entwickelt werden, sondern nur gegen ein ähnliches. Der Einsatz von Antibiotika, besonders der topische, ist also unter Resistenzbetrachtungen sorgsam abzuwägen.

2.2.7 Aminoglycoside

Die Stoffe dieser Gruppe sind klassische Antibiotika, die von natürlichen Produzenten (Actinomyceten) hergestellt werden und zumeist auch keiner weiteren synthetischen Veränderung bedürfen. Als erster Vertreter der Aminoglycoside wurde 1943 Streptomycin aus *Streptomyces griseus* von Schatz, Bugie und Waksman entdeckt [25, 55, 56]. Es folgten Neomycin aus *Streptomyces fradiae* 1949, Kanamycin aus *Streptomyces kanamyceticus* 1957 und Gentamicin aus *Micromonospora purpurea* 1962 [2]. Ein paar weniger bedeutsame

Vetreter (Amikacin) werden auch partialsynthetisch aus fermentativ vorgebildeten Produkten hergestellt.

Der Struktur nach sind es Tri- oder Oligosaccharide, die aus einem mehrfach substituierten Aminocyclohexanol-Ring und Zuckern und/oder Aminozuckern bestehen, die glycosidisch miteinander verknüpft sind (siehe Abb. 7).

Das breite Wirkspektrum der Aminoglycoside umfasst v.a. gramnegative Erreger, wie Enterobakterien, Pseudomonaden, aber auch Staphylokokken, Salmonellen, Shigellen und Mycobakterien [49, 50]. Diese Erreger müssen zwangsläufig aerobe Erreger sein, da die Aminoglycoside nur über ein Sauerstoff-abhängiges Transportsystem in die Bakterienzelle aufgenommen werden. Da anaerobe Bakterien nicht über sauerstoffabhängige Mechanismen verfügen, wirken bei ihnen auch die Vertreter dieser Stoffklasse nicht .

Anwendung finden sie bei Infektionen der Nieren, Harn- und Geschlechtsorgane, aber auch der Haut, der Weichteile und des Zentralnervensystems, wobei sie systemisch wirken. Lokal wirkend, werden sie bei bakteriellen Infektionen von Wunden, und besonders am Auge angewandt (über 40 Mio. DDD allein als Ophthalmika, mit durchschnittlich 0,2 €DDD). Wichtig bzgl. Streptomycin ist seine Verwendung als Mittel gegen Tuberkulose.

Nicht unbedeutend ist auch die Verwendung in der Tiermedizin, wo ebenfalls Gentamicin, Kanamycin und Streptomycin zum Einsatz kommen. Dabei werden sie sowohl für Haus- als auch für Nutztiere verwendet zur Bekämpfung von Infektionen des Atmungstraktes, des Magen-Darmtraktes, der Harn- und Geschlechtsorgane, des Gehörgangs und anderen, aber auch zur Behandlung von Mischinfektionen, bei denen Streptomycin in Kombination mit β -Lactamantibiotika eingesetzt wird.

Zu erwähnen ist ebenfalls die grundsätzliche Möglichkeit der Verwendung im Obstbau zur Bekämpfung des Feuerbrandes, deren Zulassung aber zur Zeit ruht (vergleiche Kap. 2.1.2.3, S. 11 [7, 34, 48]).

Aminoglycoside wirken bakterizid, indem sie die Proteinsynthese hemmen. Im Gegensatz zu den Makroliden und Lincosamiden binden sie aber nicht nur allein an die 50S Einheit der Ribosomen. Streptomycin wirkt ähnlich wie die Tetracycline, indem es an der 30S Untereinheit ansetzt und durch die Bindung zu einem Protein dieser Untereinheit die Ausbildung des Startkomplexes für die Proteinsynthese verhindert. Dies bewirkt eine Störung der Bindung der N-Formylmethionin-t-RNA und somit eine Hemmung schon in der Initiationsphase [57]. Die anderen Aminoglycoside wirken durch Bindung an beide Untereinheiten.

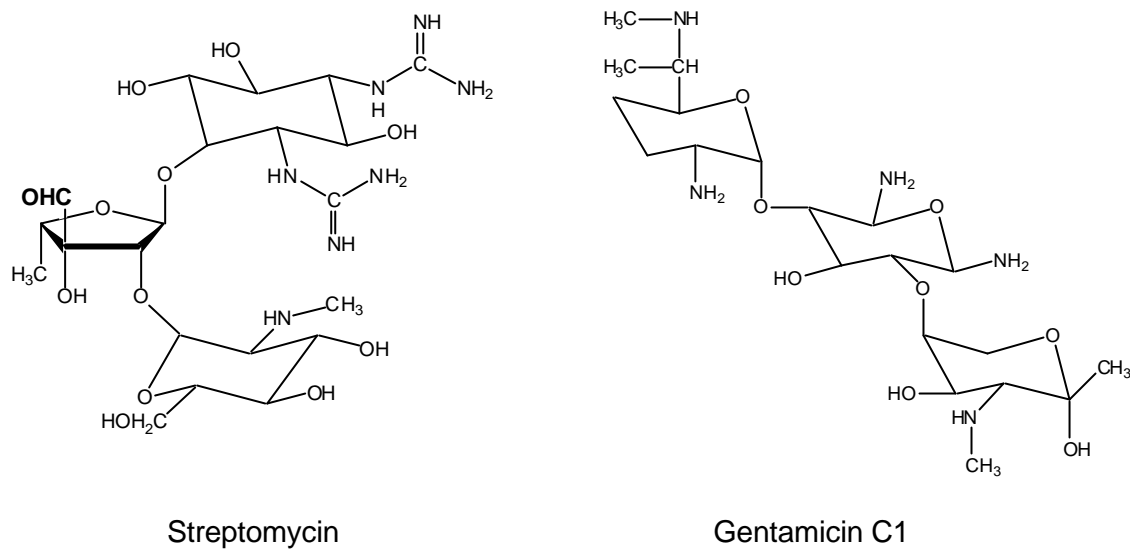


Abbildung 7: *Strukturen von Streptomycin und Gentamicin*

Das Ansetzen an die 50S Untereinheit hat zur Folge, dass wie bei den Makroliden das Umdocken der Peptidyl-t-RNA von der Akzeptorstelle an die Donorstelle unterbunden wird und dadurch die Synthese nur unvollständig verläuft. Des Weiteren werden Fehler bei der Translation ausgelöst, wodurch falsche Enzym- und Strukturproteine aufgrund falscher Sequenzen entstehen, sogenannte „Nonsense“-Proteine. Diese haben zur Folge, dass Membranschädigungen auftreten, welche zum Austritt von niedermolekularen Bestandteilen (z.B. Aminosäuren, Nucleotide, Kalium) aus der Zelle führen und schließlich zum Zelltod. Der Effekt, ob es nur zu fehlerhaften Peptidverlängerungen oder zur Hemmung der Synthese kommt ist bei den Aminoglycosiden konzentrationsabhängig.

Aber auch gegen die Aminoglycoside haben Bakterien rasch Resistenzen entwickeln können, die auf Folgendem beruhen:

- Inaktivierung der Substanzen mit Hilfe von enzymatischen Phosphorylierungen, Adenylierungen, Acetylierungen. Diese Resistenzmechanismen beruhen auf R-Faktoren und Plasmiden als Informationsträger, wodurch eine Weiterverbreitung recht einfach möglich ist [49].
- zum Schutz gegen Streptomycin kann die Bindungsstelle an der Untereinheit der Ribosomen in ihrer Form oder Struktur verändert werden

- sauerstoffabhängige Transportmechanismen der Bakterien durch die Aminoglycoside durch die Membran in die Zelle eingeschleust werden, können zeitweise ausgesetzt werden

Gegen Gentamicin waren in klinischen Isolaten von *Escherichia coli* 6 %, *Proteus mirabilis* 9 %, *Enterobacter cloacae* 2 % resistent, von *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* und coagulasenegativer *Staphylokokken* hingegen 17 %, 14 % bzw. 49 %. Die Resistenzen gegen Tobramycin zeigten ein sehr ähnliches Bild [9]. In Krankenhausabwässern waren 5 von 12 Isolaten (> 40 %) resistent gegen Kanamycin, in Kläranlagenwässern (Zulauf, Ablauf), sowie in einem Oberflächengewässer jedoch weniger als 10 % [8].

2.3 Resistenzproblematik

2.3.1. Ausmaß und Bedeutung von Resistenz

Wie erwähnt, ist es durchaus möglich, dass ein Keim Resistenzen gegen Antibiotika aus verschiedenen Klassen trägt [38]. Mitunter kann es sogar vorkommen, dass durch erworbene Multiresistenzen scheinbar kein Antibiotikum mehr zu wirken vermag. Untersuchungen zeigten, dass manche Stämme besonders häufig Mehrfachresistenzen tragen. So betrug die durchschnittliche Anzahl bei *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen 6 Resistenzen. Es wurden auch schon Enterokokken-Stämme isoliert, die bis zu 14 verschiedene Resistenzen trugen [27]. Solche Bakterien waren zum Teil nur noch sensibel gegen Reserveantibiotika wie Vancomycin, welches lediglich in den Fällen eingesetzt wird, wenn andere Antibiotika versagen. Allerdings wurden auch schon Erreger gefunden, die gegen dieses Antibiotikum resistent sind, z.B. Enterokokken (VRE)⁶ [6]. Es ist aber auch möglich, dass Bakterien die erworbenen Resistenzen wieder verlieren (wenn der Stamm gewisse Zeit der Substanz nicht mehr ausgesetzt ist) und dadurch wieder sensibel werden [58, 59].

Schließlich sei erklärt, dass auch Bakterien, die als resistent bezeichnet werden, sich noch weiter mit dem Wirkstoff behandeln lassen, gegen den diese Resistenz besteht. Es wird sogar von wissenschaftlicher Seite empfohlen, gegen solche Erreger weiterhin diesen Wirkstoff zu verwenden, jedoch mit deutlich höheren, hemmenden Konzentrationen, um die Bakterien sicher abzutöten. So wird verhindert, dass Resistenzen gegen die Stoffe weitergegeben werden und dem vorgebeugt, dass Resistenzen gegen andere Antibiotika entstehen [60] Da sich der

⁶ VRE:

Vancomycin resistente Enterokokken

Begriff „Resistenz“ auf eine festgelegte Einsatzkonzentrationen der Antibiotika bezieht, heißt „Resistenz“ nämlich nicht, dass ein Stoff überhaupt nicht mehr wirkt.

Man muss in einem solchen Fall eben die Konzentration mindestens auf die minimale Hemmkonzentration (MHK) erhöhen. Liegt bei *Escherichia coli* die MHK z.B. bei 2 mg/L Ampicillin, so heißt das, dass man mindestens eine solche Konzentration verwenden muss, um *E. coli* wirksam zu bekämpfen. In Deutschland sind die Begriffe „resistent“, „intermediär“ und „sensibel“ gemäß einer DIN-Vorschrift⁷ definiert [61-64]. Diese gibt für jedes Antibiotikum im Einzelnen die Konzentrationsstufen an, die als Grenze für Sensibilität bzw. Resistenz, bezogen auf gewisse Kontrollstämme, gelten. So sind beispielsweise als Grenzwerte für Erythromycin angegeben: sensibel < oder = 1 mg/L, resistent > oder = 4 mg/L (intermediär = 2 mg/L) [65]. Die minimale Hemmkonzentration von Erythromycin für sensible Stämme darf hier also höchstens 1mg/L betragen. Liegt die MHK darunter, wird das Wachstum also vielleicht sogar schon bei 0,25 mg/L gehemmt, so ist der Stamm natürlich ebenfalls sensibel. Wächst ein Stamm dagegen noch bei einer Konzentration von 4 mg/L und wird erst bei 8mg/L gehemmt (Anstieg der MHK), so gilt als resistent, kann aber immer noch mit dem gleichen Antibiotikum bekämpft werden.

2.3.2 Auslösung von Resistenzen

Die Entstehung von Resistenz ist ein Vorgang, der sowohl von der Konzentration der Antibiotika, als auch von der Dauer der Einwirkung abhängig ist [6, 7, 9]. Bei den üblicherweise eingesetzten Konzentrationen ist durchaus auch mit der Induktion von Resistenzen zu rechnen, sofern diese Konzentrationen nicht gerade bakterizid wirken. Besonders die Anwendung in subtherapeutischer Dosierung (sei es fälschlicher Weise oder gewollt, siehe Kap. 2.1.2.2) steht im Verdacht, die Ausbildung von Resistenzen zu unterstützen. Allerdings muss unterschieden werden zwischen der Entwicklung von Resistenzen (z.B. durch Mutationen der Plasmide) und der Verbreitung und Weitergabe. Steht die Entwicklung direkt in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Antibiotika, so kann die Weitergabe durch Transduktion, Transformation und Konjugation auch ohne deren Präsenz

⁷

weitere Grenzwerte, die zur Beurteilung der Sensibilität oder Resistenz eines Stammes herangezogen werden können, gibt das NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), das SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Communiqué), das BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) oder das GENARS (German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance)

stattfinden, da es hier nur um die Verbreitung oder den Austausch von genetischem Material geht, welches die erforderliche Information schon enthält [1].

Durch Untersuchungen klinischer Isolate (siehe auch Kap. 2.2) konnte gezeigt werden, dass die üblicherweise in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzten Konzentrationen (therapeutisch, prophylaktisch, oder als Leistungsförderer in subtherapeutischen und nutritiven Dosen) zur Resistenzentwicklung führen können [5, 7, 9]. Allerdings stellt sich die Frage, welche Konzentrationen mindestens erforderlich sind, um eine Resistenz auszulösen. Denn auch wenn gewisse Konzentrationen nicht gerade bakteriostatisch oder bakterizid wirken und eine Wachstumshemmung nicht direkt deutlich sichtbar wird, so kann es dennoch sein, dass allein die Anwesenheit der Stoffe dazu führt, dass Bakterien manche Prozesse umstellen. Die Anwendung in subtherapeutischer Konzentration hat zwar keine abtötende Wirkung, aber es entsteht dennoch möglicherweise eine Beeinflussung oder Hemmung, da z.B. eine gewisse Anzahl von Bindungsstellen besetzt wird oder Zielmechanismen in den Bakterien beeinflusst werden, was sich auf Vorgänge in den Bakterien auswirken kann.

Dies geschieht in den Fällen und ab den Konzentrationen, durch die das mikrobiologische Gleichgewicht eines Biotops (z.B. Schleimhäute, Darm, Haut) gestört wird. Werden durch die Anwesenheit bestimmter Konzentrationen sensible Bakterien in ihrem Wachstum behindert, so können hingegen resistente Mutanten Wachstumsvorteile erlangen. Dazu sind normalerweise Konzentrationen nötig, die über dem Bereich der minimalen Hemmkonzentration liegen, also im niedrigen mg/L Bereich (bei manchen Spezies liegt dieser sogar nur bei 10-30 µg/L [63]). Es gibt aber auch Mechanismen, die bei Konzentrationen darunter ausgelöst werden, z.B. regulatorische Prozesse, wie die Erhöhung der Produktion von Substanzen, damit Zellvorgänge weiter ablaufen können, oder Produktion von Enzymen zur Ausschleusung von Störstoffen aus der Zelle, so dass vorübergehend eine erhöhte Toleranz gegenüber Antibiotika besteht [66]. Solche regulatorischen Prozesse stellen aber keine eigentliche Resistenz dar, die durch Gentransfer weitergegeben werden kann. Während die nicht-gesteuerten Mechanismen zum Schutz der Bakterienzelle schon bei etwas niedrigeren Konzentrationen aktiviert werden, die möglicherweise im µg/L-Bereich liegen, sind zur Induktion von Resistenzen also Konzentrationen nötig, die gewöhnlich im mg/L-Bereich liegen, in Ausnahmefällen (je nach Medium und Bakterienart) auch etwas darunter.

Neben dieser „erzwungenen“ Resistenz kann es allerdings auch zu natürlichen Resistenzen kommen, also ohne den Selektionsdruck, den Antibiotika ausüben. Wie bereits gesagt, handelt es sich bei den Resistenzen oft um Mutationen der Gene. Diese können in Bakterienzellen durchaus auch spontan auftreten, was mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-6}

bis 10^{-10} geschieht [67, 68]. Im Normalfall sind diese Mutanten dem Wildtyp unterlegen, doch wenn Antibiotika auftreten, haben sie einen entscheidenden Vorteil.

2.4 Einsatzmengen

2.4.1 Therapeutische Dosen von Humanarzneimitteln

Die MHK⁸ der meisten Antibiotika zur *Einteilung* in sensible und resistente Keime liegen für die Hemmung von sensiblen Keimen meist im Bereich von wenigen mg/L. Da dies aber nur eine Schwelle zur Abgrenzung ist, kann es sein, dass die tatsächliche MHK der meisten Keime noch deutlich darunter liegt, dass sie also schon in geringeren Konzentrationen abgetötet werden. Dies hängt aber sowohl von den Keimen, als auch entscheidend von den Antibiotika ab. Um sicherzustellen, dass eine hemmende Wirkung auch tatsächlich auftritt, muss die Konzentration, der die Bakterien ausgesetzt werden, mindestens so hoch wie die aktuelle MHK sein, besser deutlich darüber und über eine gewisse Dauer. Das heißt also, dass eine Konzentration bei systemischer Anwendung im Körper durchschnittlich eher 5-20 mg/L betragen sollte (oft wird daher eine Spitzenkonzentration des Serum- oder Gewebespiegels von einem Mehrfachen, sogar das 10-20fache, der MHK₉₀ des Erregers erreicht und angestrebt [69-72]⁹). Damit diese Konzentrationen während der Therapie auch über einen gewissen Zeitraum im Körper vorliegen und der Talspiegel nicht oder nur selten unter die Wirkungsschwelle absinkt, ist es nötig, dass manche Präparate mehrmals täglich genommen werden müssen [73, 74]. Grund dafür ist die unterschiedliche Halbwertszeit der Substanzen im Körper [74-76], die je nach dem 1 Stunde, aber auch 70-100 Stunden lang sein kann (siehe Tab. 2). Um für Präparate der gleichen therapeutischen Gruppe eine gleiche Wirkungsstärke zu erreichen (auch unter Berücksichtigung des Abbaus), bedürfen manche schwächer wirksame einer höheren Dosierung als andere. Daraus ergeben sich die Unterschiede in den DDD. Zwischen verschiedenen therapeutischen Gruppen (z.B. Behandlung von Infektionen versus Aknetherapie) ist die Wirkungsstärke jedoch nicht zu vergleichen, da unterschiedliche Indikationen behandelt werden sollen. Auch ist eine Vergleichbarkeit zwischen topischer, oraler und parenteraler Applikation nur schwer möglich.

⁸ gemäß DIN 58940

⁹ MHK₉₀ Minimale Hemmkonzentration, bei der 90 % der isolierten Erreger in ihrem Wachstum gehemmt werden, 10 % brauchen nicht mit Hilfe dieser Konzentration gehemmt zu werden

Table 2: *Halbwertszeiten, Applikationshäufigkeit, und errechnete tägliche Dosen verschiedener Antibiotika bei oraler Applikation*

Antibiotikum	Halbwertszeit	Applikation [mg]	tägl. Dosis ¹⁰ [mg]	DDD [mg] ¹¹
Amoxicillin	1-2 h	2-4 x	1500-3000	1000
Azithromycin	> 14 h	2 à 600 pro Woche	-	300
Cefaloclor	~2 h	3 x 500	1500	1000
Cefixim	~2 h	1 x 400	400	400
Ciprofloxacin	3-4 h	2 x 125 bis 2 x 500	1000	1000
Clarithromycin	2-5 h	2 x 250	500	500
Clindamycin	2-3 h	4 x	600-1800	1200
Doxycyclin	10-20 h	1 x 200	200	100
Erythromycin	< 2,5 h	2-4 x	1500-2000	1000
Flucloxacillin	1-2 h	3 x 2 à 500	3000	2000
Levofloxacin	7-8 h	1 x 250 bis 1-2 x 500	500-1000	500
Moxifloxacin	> 10 h	1 x 400	400	400
Sulfamethoxazol	10 h	2 x 800	1600	2000
Teicoplanin	70-100 h	1 x 400	400	400
Trimethoprim	10 h	2 x 160	320	400
Vancomycin	6-8 h	4 x 250	1000	2000

Nimmt man eine Standardtagesdosis von 1000 mg an, so ergibt sich direkt nach Applikation, unter der Annahme, dass ein Erwachsener 50 kg flüssigkeitshaltiges Gewebe hat (also annähernd 50 L), eine Gewebekonzentration von 20 mg/L. Sinkt diese bedingt durch eine Abnahme während des Tages bis zur nächsten Applikation um 50-75 %, so resultiert dennoch ein Talspiegel von 5-10 mg/L, der ausreichen soll, um eine Hemmung weiter zu leisten. Bezogen auf das Körpergewicht liegen die durchschnittlichen täglichen Dosen je nach Wirkungsstärke der Substanz zwischen 5 und 50 mg/kg Körpergewicht. In schweren

¹⁰ tägl. Dosis aus der Applikation berechnet

¹¹ DDD gemäß ATC/DDD Index des WHO Collaboration Centre for Drug Statistics Methodology

Infektionsfällen kann diese Konzentration auch schon mal auf 100 mg/kg KGW/d angehoben werden (z.B. bei Flucloxacillin [36]).

Schwieriger abzuschätzen sind die Konzentrationen, die bei lokaler Applikation auftreten. Da aber das Auftragen der Salben, Cremes oder Tropfen nur auf kleine Flächen erfolgt und keine weitere Verteilung geschieht, sind hier die DDD deutlich kleiner als bei oraler oder parenteraler Anwendung.

2.4.2 Therapeutische und leistungsfördernde Dosen in der Veterinär Anwendung

Die Hemmkonzentrationen, die zur Bekämpfung von Keimen erforderlich sind, sind weitestgehend unabhängig vom Wirtsorganismus [7]. Folglich sollten auch die Serum- und Gewebekonzentrationen der Antibiotika zur **therapeutischen Behandlung** im Tier ähnlich der beim Menschen sein. Dosierungen von Tierarzneimittel-Präparaten werden gewöhnlich direkt in mg/kg KGW angegeben, so dass die Gabe auf jedes Tier individuell nach der Größe abgestimmt werden muss. Eine andere übliche Dosierungsart erfolgt über die Einmischung ins Futter, oder in das Trinkwasser, so dass die Konzentrationen darin auf die Futter- bzw. Trinkwasser-Aufnahme des Tieres abgestimmt werden muss [40].

Die Mengen pro kg KGW sind vergleichbar mit der Anwendung beim Menschen. Sie liegen zwischen 2,5 mg/kg KGW/d zum Beispiel für Enrofloxacin, 10-40 mg/kg KGW/d Ampicillin, 20 mg/kg KGW/d für Chlortetracyclin und 50-100 mg/kg KGW/d für Sulfadimidin. Um zu verhindern, dass ein gewisser Talspiegel unterschritten wird, ist es in Abhängigkeit von der Halbwertszeit im Tierkörper erforderlich, manche Präparate mehrmals am Tag zu verabreichen. Nimmt das Tier die Wirkstoffe selbständig über das Futter auf, so braucht nicht damit gerechnet zu werden, dass die Konzentrationen einen Sollwert unterschreiten.

In der **Leistungsförderung** werden die Wirkstoffe nur direkt mit dem Futter aufgenommen. Da sie auf die Darmflora leicht hemmende Effekte haben sollen, bzw. deren Zusammensetzung in einen gewünschten Bereich verschieben sollen, sind die eingesetzten Mengen deutlich niedriger als in der therapeutischen und prophylaktischen Anwendung [5, 27, 30, 40]. Dadurch, dass es aber andere Wirkstoffe sind, sind die Dosen jedoch nicht direkt vergleichbar. Zur Einmischung in das Futter, oder auch in direkter fertiger Mischung bestehen für die vier erlaubten Wirkstoffe Mindest- und Höchstgehalte, die eingehalten werden müssen und die einen leistungsfördernden Wirkungsbereich einschließen (siehe Tab. 3) [77].

Table 3: *Zieltierarten und Grenzwerte für antimikrobielle Leistungsförderer in Alleinfuttermitteln [mg/kg]*

Wirkstoff		Tierart	Mindestgehalt [mg/kg]	Höchstgehalt [mg/kg]
E 717	Avilamycin	Ferkel	20	40
		Mastschweine	10	20
		Masthühner	2,5	10
E 712	Flavophospholipol	Kaninchen	2	4
		Legehennen	2	5
		Trut-, Masthühner	1	10
		Ferkel	10	25
		Schweine	1	20
		Kälber	6	16
		Mastrinder	2	10
E 714	Monensin	Mastrinder	10	40
E 716	Salinomycin-Natrium	Ferkel	30	60
		Mastschweine	15	30

Im Vergleich dazu liegen die Dotierungen von Futtermitteln mit therapeutischen Antibiotika deutlich höher, z.B. Erythromycin wird mit 100 mg/kg Futtermittel für Zuchtsauen und Ferkel verabreicht, Chlortetracyclin bis 600 mg/kg Futtermittel für Schweine und 400 mg/kg für Geflügel, Sulfadimidin sogar bis 2000 mg/kg Futtermittel für Schweine und Kälber. Die prophylaktisch eingesetzten Mengen betragen etwa die Hälfte davon [40].

Die zur Leistungsförderung eingesetzten Stoffe werden, verallgemeinert gesagt, nur in Konzentrationen eingesetzt, die ein Zehntel und weniger der therapeutischen Dosen betragen. Folglich liegen auch die Serum- und Gewebekonzentrationen in dieser Größenordnung unter der therapeutischen Dosis und damit in einem Bereich, der gerade an der Hemmschwelle für die Bekämpfung von Bakterien liegt. Bei Monensin für Mastrinder muss sogar extra darauf geachtet werden, dass die eingesetzten Mengen nicht zu hohe Gehalte im Tier ergeben. Gemäß einer Mitteilung der EU-Kommission [77] muss die Gebrauchsanweisung folgenden Hinweis enthalten: "Die Menge an Monensin-Natrium in der Tagesration darf für 100 kg Körpergewicht 140 mg nicht überschreiten". Daraus ergibt sich eine theoretische

Konzentration im Serum oder Gewebe von etwa 2 mg/L, also ähnlich der MHK-Schwelle mancher Antibiotika für sensible Keime (siehe 2.3.1).

Neben dem Einsatz als antimikrobielle Leistungsförderer, werden solche Antibiotika (Monensin, Salinomycin) in Futtermitteln auch zu einem anderen Zweck, nämlich als Zusatzstoffe zur Verhinderung der Kokzidiose und Histomoniasis eingesetzt. Dabei liegen die Konzentrationen in der gleichen Größenordnung, wie bei den Leistungsförderern, also nahe der therapeutischen Effektivität.

2.5 Verkaufs- und Absatzmengen

Insgesamt, als Summe aller Anwendungen bei Menschen und Tieren, wurden 1997 in der EU (inkl. Schweiz) 12.752 t Antibiotika verbraucht. Davon wurden 7.659 t für die Humananwendung und 5.093 t im Veterinärbereich angewendet. Zum therapeutischen und prophylaktischen Einsatz kamen hiervon 3.494 t, zur Leistungsförderung 1.599 t. Im Jahr 1999 nahm die Gesamtmenge (bezogen auf 1997) um knapp 4 % zu, während die Menge an Leistungsförderern um 50 % abnahm [28]. Therapeutische und prophylaktische Zwecke bei Mensch und Tier ließen die Antibiotikaabsätze um jeweils etwa 11 % ansteigen (siehe Tab. 4).

Table 4: Einsatzmengen von Antibiotika in der EU (inkl. Schweiz)

Einsatz	1997	1999	Differenz
Gesamtmenge	12.752 t	13.216 t	+ 3,6 %
Humananwendung	7.659 t	8.528 t	+ 11,4 %
Veterinäranwendung	5.093 t	4.688 t	- 8,0 %
- therapeut./prophylakt.	3.494 t	3.902 t	+ 11,7 %
- Leistungsförderung	1.599 t	786 t	- 50,8 %

Grund für den starken Rückgang bei den Leistungsförderern ist wahrscheinlich, dass zwischen 1997 und 1999 allein fünf Substanzen für diesen Zweck verboten worden sind [44, 78], nämlich Avoparcin, Zink-Bacitracin, Virginiamycin, Tylosin und Spiramycin. Mit dem

Verbot von Carbadox und Olaquinox 1999 dürfte der Bereich der Leistungsförderung seitdem noch stärker zurückgegangen sein. Das erwähnte Verbot aller Leistungsförderer, bis auf Avilamycin, ab 2006 wird sein übriges tun, dass dieser Bereich weiter abnimmt.

Für Deutschland gibt es keine genauen Angaben was die Gesamtabatzmenge betrifft, oder auch die Menge an verbrauchten Veterinärantibiotika. Speziell zu letzterem gibt es nur grobe Abschätzungen oder regionale Erhebungen, die aber nicht unbedingt repräsentativ für das gesamte Bundesgebiet sind, da die Landwirtschaft regional sehr verschieden orientiert ist [79-83]. Als Trend war in solchen Untersuchungen und Befragungen jedoch feststellbar, dass in der Veterinär Anwendung der beobachteten Regionen in Deutschland vor allem Tetracycline mit über 50 % den Hauptteil ausmachten (siehe auch [84]). Daneben wurden knapp 20 % Sulfonamide eingesetzt und danach folgten erst Aminoglycoside und andere¹².

2.5.1 Absatz von Antibiotika im Humanbereich

Antibiotika zur Humananwendung wurden 1998 in Deutschland gemäß einer Erhebung mit 412 t verschrieben. 103 t davon wurden in Kliniken und Krankenhäusern verwendet, der Rest nach Verschreibung durch niedergelassene Ärzte [31]. Dabei wurde festgestellt, dass der Verbrauch innerhalb der letzten Jahre stetig leicht anstieg. Nach einer anderen Abschätzung für das Jahr 1995 wurden in Deutschland beispielsweise 25-128 t Amoxicillin im Humanbereich verwendet, 140 t Penicillin V, 16-76 t Sulfamethoxazol, 3-15 t Trimethoprim, 4-20 t Erythromycin, 8-16 t Doxycyclin [15]. Neuere Zahlen bieten das Institut für Medizinische Statistik und das Umweltbundesamt, die den Humanbereich genau auftrennen zwischen Hospital und Apotheke (siehe Tab. 5) [85].

¹² Tierarzneimittel

Gemäß einer Schätzung der FEDESA (Fédération Européenne de la Santé des Animaux; europäischer Verband für Tiergesundheit) aus dem Jahr 1998 wurden in Deutschland zw. Juli 1997 und Juni 1998 insgesamt 500 t Antiinfektiva im Veterinärbereich angewandt .

Tabelle 5: Verkaufsmengen von verschiedenen, absatzstarken Antibiotika der Humananwendung in 1998 und 2001 [kg/a]

Substanz	1998 Hospital	1998 Apotheke	2001 Hospital	2001 Apotheke	1998 Gesamt	2001 Gesamt
Amoxicillin	13068,0	92282,7	12574,2	102809,8	105350,6	115384,0
Ampicillin	11734,1	2613,6	11487,2	1932,1	14347,7	13419,3
Ciprofloxacin	4423,1	8421,9	5588,5	12384,8	12845,1	17973,3
Clindamycin	2021,3	8142,4	3062,5	13018,3	10163,7	16080,8
Doxycyclin	369,7	13109,7	304,6	12039,6	13479,5	12344,2
Erythromycin	1586,1	25456,3	1279,0	17920,0	27042,3	19199,0
Penicillin V	1530,7	88452,2	1360,0	81163,3	89982,9	82523,3
Sulfamethoxazol	7297,6	51066,2	6539,2	47061,1	58363,9	53600,3
Trimethoprim	1531,5	10964,5	1369,0	10057,6	12496,0	11426,6
Vancomycin	716,7	60,4	986,9	61,5	777,1	1048,4

Anhand der Tabelle kann man deutlich sehen, dass es große Unterschiede in den Verschreibungspraktiken gibt: Manche werden deutlich häufiger von niedergelassenen Ärzten verordnet, wohingegen andere fast nur im Krankenhausbereich zum Einsatz kommen (z.B. Vancomycin, welches als Reserveantibiotikum gilt). Auch zwischen verschiedenen Jahren kann es zu Veränderungen kommen. Der Trend bei den Makroliden und Lincosamiden (weniger ERY, dafür mehr CLI) hat sich auch im folgenden Jahr weiter fortgesetzt [37]. Gründe dafür können häufig das Erscheinen eines Generikappräparates auf dem Markt sein, die Neueinführung von anderen Wirkstoffen oder aber eine veränderte Resistenzsituation. Was die Gesamtzahlen betrifft, so machen alleine die hier aufgelisteten 10 Substanzen eine Verkaufsmenge (in 2001) von über 340 t aus. Davon wurden im Schnitt 15 % über die Hospitäler abgesetzt. Diese Zahl setzt sich allerdings sehr unterschiedlich zusammen: Bei Ampicillin betrug der Anteil der Hospitäler 86 %, bei Vancomycin sogar mehr als 94 %. Im Gegensatz dazu geschah der Absatz von Doxycyclin und Penicillin V mit jeweils mehr als 97 % fast ausschließlich über die Apotheken.

Um zu aktuellen Zahlen zu gelangen, ist es nötig, die Anzahl der gesamten verordneten Dosen eines Wirkstoffes innerhalb des gewünschten Jahres zu kennen, was aber anhand des

aktuellen Arzneiverordnungsreportes [37] möglich ist. Erschwerend kommt allerdings hinzu, dass die Wirkstoffe in verschiedensten Indikationsgruppen verwendet werden, und eine Vielzahl von Präparaten betrachtet werden muss. Hat man die Gesamtzahl der verordneten Tagesdosen, so kann man durch Verrechnung mit den DDD (Werte der WHO sind öffentlich zugänglich [86], es können DDD auch anhand der Applikationen der verschiedenen Medikamente abgeschätzt werden) für den jeweiligen Wirkstoff eine verordnete Gesamtmenge pro Jahr erhalten. Beispielhaft sei dies hier für ein paar Substanzen getan, wobei es sich zum einen um solche Präparate handelt, die nicht dermal appliziert werden, sondern ausschließlich oral oder parenteral (bei Salben, Cremes und Gelen ist die Angabe einer DDD sehr schwierig, da mit diesen topischen Mitteln, je nach Aussehen der Infektion unterschiedlich große Flächen behandelt werden). Ergänzend sei aber auch für topisch aufgetragene Antiaknemittel am Beispiel von Präparaten des Erythromycins eine solche Berechnung versucht.

2.5.1.1 Amoxicillin (als mengenmäßig bedeutendstes Antibiotikum)

Sortiert nach Anwendungsgebieten, also den Hauptgruppen der Arzneimittel, werden in Deutschland Amoxicillin-Präparate nur als generelle Antibiotika/Antiinfektiva (Hauptgruppe 10 des Arzneimittelverzeichnis für Deutschland „Rote Liste“) verwendet. Daneben gibt es ein Präparat, das als Magen-Darm-Mittel (Hauptgruppe 60) angewandt wird. Innerhalb der HG 10 gab es 66,2 Mio. verordnete DDD mit Amoxicillin als alleinigen Wirkstoff, und 4,9 Mio. DDD als Kombinationspräparat mit Clavulansäure bzw. Flucloxacillin. Das Präparat der HG 60 wurde mit 1,1 Mio. DDD in 2002 verordnet. Bei den Einzelwirkstoffpräparaten wird je nach Schwere der Infektion eine Tagesdosis von 1,5-3 g angestrebt (im Mittel also 2,25 g), bei den Kombinationsmedikamenten und dem Magen-Darm-Mittel eher 1,5 g. Bezogen auf diese DDD, wurden von Amoxicillin 2002 etwa 158 t verwendet. Bezieht man die Verschreibungen auf die DDD der WHO von 1000 mg, so sind es etwa 72 t, die abgegeben wurden. Da bei Amoxicillin die Anwendungsdosis stark von der Infektionsart abhängt, ist eine genaue Aussage betreffend Gesamtanwendungsmenge nur sehr bedingt zu treffen. Sie wird wohl zwischen den beiden berechneten Werten liegen.

2.5.1.2 Cotrimoxazol[®] (Sulfamethoxazol/Trimethoprim-Kombinationspräparat)

Diese Wirkstoffe werden nur in Hauptgruppe 10 angewendet, also zur allgemeinen Behandlung von Infektionen. Dabei werden sie nur in der Kombination von 5:1 (auf die Masse bezogen) angewendet. Trimethoprim besteht darüber hinaus auch als Einzelmedikament auf dem Markt, zählt aber nicht zu den Medikamenten mit häufigem Einsatz. Die zwei einzigen Präparate, in denen es als Einzelsubstanz verwendet wird, wurden mit insgesamt 1,1 Mio. DDD zu 400 mg (WHO ebenfalls 400 mg) verschrieben. Demgegenüber wurden von den Kombinationspräparaten 25,2 Mio. DDD¹³ verordnet, wobei die DDD für Sulfamethoxazol 1600 mg (WHO 2000 mg) und für Trimethoprim 320 mg betragen. Insgesamt wurden somit im Jahr 2002 ca. 40 t (50 t, gem. WHO-Werten) an SMX und knapp 9 t (11 t, WHO) an TRI in Deutschland im Humanbereich angewendet.

2.5.1.3 Phenoxymethylpenicillin (Penicillin V)

Dieses klassische β -Lactamantibiotikum ist im Humanbereich, wie auch Cotrimoxazol, nur in Präparaten zur allgemeinen Bekämpfung von Infektionen zu finden (Hauptgruppe 10). In dieser Gruppe existieren 22 Präparate, die PCV als alleinigen Wirkstoff verwenden und ein Präparat, in Kombination mit Benzathin. Von diesen 23 Mitteln zählen 16 zu den 3000 verordnungsstärksten Medikamenten in Deutschland. Die restlichen sieben sind bei einer Verordnungshäufigkeit von jeweils weniger als 33 Tausend Verschreibungen (nach Umrechnung in verordnete DDD sind das weniger als 0,3 Mio. pro Medikament, also weniger als 2,1 Mio. DDD gesamt) nicht in der Liste der häufigsten aufgeführt und haben daher nur untergeordnete Bedeutung; zumal die restlichen Präparate mit 33,9 Mio. DDD mindestens 94 % der PCV-Mittel abdecken. Mit einer durchschnittlichen Tagesdosis von etwa 2000 mg/Tag (3-4 x 590 mg reinem Wirkstoff, -WHO auch 2000 mg-) ergibt dies eine Gesamtmenge von etwa 68 t Penicillin V, die in Deutschland im Jahr 2002 verschrieben wurde.

¹³ Cotrimoxazol-Präp. Gemäß Rote Liste 2002 waren im Jahr 2002 in Deutschland 21 Sulfamethoxazol-Präparate (in Kombination mit Trimethoprim) auf dem Arzneimittelmarkt verfügbar. Die hier aufgeführten 25,2 Mio. DDD stammen von 16 Präparaten, die zu den 3000 verordnungsstärksten Medikamenten gehörten. Die fünf restlichen Präparate wurden mit jeweils weniger als 0,2 Mio. DDD deutlich seltener verschrieben (insgesamt unter 1 Mio. DDD; genaue Zahlen sind jedoch nicht verfügbar)

2.5.1.4 Erythromycin

Erythromycin wird in verschiedenen Arzneimittelgruppen eingesetzt, so dass es eine Vielzahl von Medikamenten gibt, von denen allerdings einige recht selten verordnet werden, somit kaum Bedeutung haben und hier in der Berechnung nicht einbezogen werden. Betrachtet werden daher nur Medikamente, die unter die 3000 am häufigsten verordneten fallen. Die Haupteinsatzgebiete sind die „normale“ Bekämpfung von Infektionen (HG 10: Antiinfektiva) und die Behandlung von Akne (HG 32: Dermatika); daneben gibt es auch den Einsatz in Augensalben (HG 67: Ophthalmika) und in Hustenmitteln (HG 24: Antitussiva/Expektorantia).

Die Präparate der HG 10 werden, wie schon in Tab. 2 aufgeführt, mit täglichen Dosen von 1500-2000 mg eingesetzt (WHO 1000 mg). In diese Indikation fielen Verschreibungen von 9,0 Mio. DDD, was eine Masse von 13,5-18 t (9 t, WHO) bedeutet. Die Anwendung im Fall der Aknebehandlung, ergab im Jahr 2002 sogar 9,8 Mio. DDD von Einzelpräparaten und 8,1 Mio. DDD von Kombinationspräparaten (mindestens, da ja verschreibungsschwache Medikamente nicht darin enthalten sind). Die Präparate (Einzel- und Kombinations-) sind meist auf Konzentrationen von 2-4 % eingestellt. Einzelne Lösungen, Salben oder Gele enthalten auch nur 1 % des Wirkstoffes. Zumeist erfolgt die Anwendung zweimal täglich, morgens und abends, wobei die Mittel (dünn) auf die betroffenen Hautstellen aufgetragen werden. Am Anfang einer Behandlung, also in den ersten vier Wochen, kommt häufig die stärkere Konzentration zum Einsatz, die dann in der Fortführung durch die geringer konzentrierten Mittel ersetzt wird. Dabei kann sich die Anwendung oft über viele Wochen erstrecken, so dass auch Behandlungen von bis zu drei Monaten erreicht werden. In den verschiedenen Aknefällen, in denen solche Mittel verschrieben werden, gibt es zum einen Patienten, bei denen nur einzelne kleine Stellen behandelt werden, zum anderen aber auch Patienten, bei denen größere Partien des Gesichts, auch des Rückens und des Brustbereiches behandelt werden. Werden in ersterem Fall recht geringe Mengen der Lösungen benötigt (möglicherweise nur 0,5 mL oder g pro Tag), so kann es im anderen Fall durchaus zu Mengen von 1-2 mL täglich kommen.

Setzt man für die Abschätzung eines Gesamtaufkommens von dermal applizierten ERY-haltigen Mitteln die mittlere tägliche Menge auf 1 mL bzw. g der Präparate, so ergibt dies bei durchschnittlich 2 %igen Lösungen eine mittlere tägliche Dosis von 20 mg (WHO-Werte existieren nicht). Insgesamt werden also bei 17,9 Mio. verordneten DDD nur 0,4 t Erythromycin durch topische Mittel im Humanbereich verbraucht. Verglichen mit den oral genommenen Mitteln nur ein Vierzigstel. Auch unter Verwendung einer möglicherweise

höheren Einzeldosis von 1 g eines dermal applizierten Mittels, bei einer zweimaligen Auftragung pro Tag also 2 g, so sind die sich daraus ergebenden 0,8 t doch vergleichsweise unbedeutend.

Der Einsatz in der HG 67 erfolgt nur durch ein einziges Mittel, von welchem aber 3,8 Mio. DDD verordnet wurden. Bei diesem Augenpräparat erfolgt die Anwendung als Salbe (Konzentration = 5 mg/g) oder als Tropfen (5 mg/mL) mehrmals täglich (alle 2-3 h 1-2 Tropfen¹⁴), wobei insgesamt schätzungsweise 5-10 mg ERY pro Tag verwendet werden. Die Gesamtmenge dieses Ophthalmikums dürfte also 0,04 t im Jahr nicht übersteigen und wird somit nur einen vernachlässigbaren Anteil am gesamten ERY-Aufkommen liefern. Berücksichtigt man die einzelnen Anwendungsgebiete, so ergibt sich ein totaler Jahresverbrauch 2002 in Deutschland von 14-19 t.

2.5.1.5 Clindamycin

Eine auf analogen Berechnungen basierende Datenerhebung ergibt für Clindamycin, welches in ähnlicher Breite wie ERY zum Einsatz kommt, deutlich geringere Anwendungsmengen in 2002. Auch CLI wird vor allem in HG 10 (Antiinfektiva) eingesetzt, zusätzlich in Antiaknemitteln (HG 32), in Gynäkologika (HG 46) und in Biomaterialien/medizinischen Kunststoffen (HG 88). Die normalen oralen Antibiotika ergeben bei 5,8 Mio. DDD und mit einer DDD von 600-1800 mg im Durchschnitt 7 t. Das einzige Antiaknemittel ergibt bei 2,2 Mio. DDD (von 10-20 mg/Tag) nur etwa 0,04 t. Von dem gynäkologischen Präparat wurden 2002 0,5 Mio. DDD verordnet, die unter Berücksichtigung der Dosierungsanweisung der Packungsbeilage mit einer Anwendungsmenge von 100 mg/Tag, einen Beitrag von 0,05 t zur gesamten Menge leisten. Der totale Jahresverbrauch 2002 von Clindamycin dürfte somit fast ausschließlich durch orale Mittel abgedeckt werden und in einem Bereich von ca. 7 t (bzw. 4-10 t, aufgrund der DDD-Spanne) liegen.

2.5.1.6 Ciprofloxacin

Die Anwendung von Ciprofloxacin erfolgt hauptsächlich in der HG 10 mit 6,9 Mio. oral verabreichten DDD in 2002, aber auch durch ein Präparat in HG 67 (Ophthalmika) mit 3,5 Mio. DDD. Von diesem Augenmittel werden je nach Indikation zwischen 10 und 100 Tropfen (3 mg CFL/mL) am Tag verwendet. Die daraus resultierenden 3-30 mg/Tag tragen trotz der

¹⁴ Tropfen

als übliche Tropfengröße werden 0,1 mL angenommen; 810 Anwendungen à 12 Tropfen pro Tag ergeben folglich 0,8 bis 2,0 mL

häufigen Verschreibung (3,5 Mio. x 3-30 mg) mit 0,01-0,1 t zur Gesamtjahresmenge von CFL nur wenig bei. Ungleich bedeutender ist der Anteil der oral verabreichten Mittel mit einer DDD von 1000 mg, die 6,9 t ausmachen.

Tabelle 6: *Zusammenstellung der eigenen Abschätzung von Jahresaufwandmengen verschiedener Antibiotika*

Substanz	Arzneimittel-HG	Jahresmenge in 2002
Amoxicillin	10, 66	72-158 t
Ciprofloxacin	10, 67	7 t
Clindamycin	10, 32, 46, 88	7-8 t
Erythromycin	10, 24, 32, 67	14-19 t
Phenoxymethylpenicillin	10	68 t
Sulfamethoxazol	10	40-50 t
Trimethoprim	10	9-11 t

2.6 Rechtliche Regelungen zu Antibiotika, sowie ihrer Verbreitung in die Umwelt

2.6.1 Humanarzneimittel

Die rechtlichen Regelungen für Humanarzneimittel basieren auf den EU-Regelungen der Richtlinie 65/65/EWG [87], die mit dem deutschen Arzneimittelgesetz [88] umgesetzt worden sind. Darin festgelegt sind die Regelungen betreffend Definition, Anforderungen, Herstellung, Prüfung, Abgabe, Überwachung, Zulassung etc.. Die in Deutschland vermarkteten Arzneimittel, die der Bürger im allgemeinen aufnimmt, sind gemäß Definition fast nur Fertigarzneimittel¹⁵. Für verschreibungspflichtige Arzneimittel gelten über das AMG hinaus auch die Bestimmungen der Verordnung über verschreibungspflichtige Arzneimittel [89], die aufgrund der Bestimmungen des AMG erlassen worden ist. Darin geregelt ist, dass Stoffe, die

¹⁵ Fertigarzneimittel Fertigarzneimittel sind Arzneimittel, die im voraus hergestellt und in einer zur Abgabe an den Verbraucher bestimmten Packung in den Verkehr gebracht werden. (§ 4 Abs. 1 AMG)

in der Anlage der VO aufgeführt sind, nur nach Vorlage einer Verschreibung abgegeben werden dürfen. In der erwähnten Anlage sind sowohl Stoffe und Zubereitungen zur Anwendung beim Menschen, als auch beim Tier aufgeführt. Alle Antibiotika, die in Deutschland zur Therapie und Prophylaxe verwendet werden, finden sich in dieser Anlage, und dürfen daher nur nach Vorlage eines ärztlichen Attests oder einer Verordnung abgegeben werden. Es ist also ausgeschlossen, dass Personen diese Medikamente direkt und ohne ärztliche Behandlung erhalten. Somit wird Eigenmedikation vermieden und ein möglicherweise einhergehender Missbrauch. Ausgeschlossen wird dadurch jedoch nicht, dass Einzelpersonen Antibiotikareste nach der Behandlung ihrer Infektionen nicht sachgerecht entsorgen, sondern in einem vermeintlichen Bedarfsfall eigenständig und ohne fachliches Wissen wieder anwenden.

Vor der Zulassung von Stoffen zur Anwendung in Arzneimitteln, müssen sie erst ein Verfahren, gemäß AMG durchlaufen. Mittlerweile wird seit 1998 durch das Siebte Gesetz zur Änderung des Arzneimittelgesetzes ein Zulassungsverfahren auch im Hinblick auf die Umweltverträglichkeit der zuzulassenden Arzneimittel durchgeführt [90]. Dazu sind nach § 22 (2) Nr. 1, 2 neben der Vorlage verschiedenster Unterlagen und Angaben auch Ergebnisse von durchgeführten physikalischen, chemischen, biologischen oder mikrobiologischen Versuchen und von pharmakologischen und toxikologischen Versuchen vorzulegen. Demnach sind dem Antrag „alle für die Bewertung des Arzneimittels zweckdienlichen Angaben und Unterlagen, ob günstig oder ungünstig, beizufügen.“ Des weiteren findet sich eine genauere Regelung betreffend der Umweltverträglichkeit in § 22 (3c):

„Ergibt die Aufbewahrung des Arzneimittels oder seine Anwendung oder die Beseitigung seiner Abfälle besondere Vorsichts- oder Sicherheitsmaßnahmen, um *Gefahren für die Umwelt* oder die Gesundheit von Menschen, Tieren oder Pflanzen zu vermeiden, so ist dies ebenfalls anzugeben. Angaben zur Verminderung dieser Gefahren sind beizufügen und zu begründen.“

Das beinhaltet, um zu wissen, ob bestimmte Maßnahmen erforderlich sind, und welche Vorkehrungen getroffen werden sollen, dass das Mittel zunächst einer Prüfung auf Gefährdung der Umwelt unterzogen werden muss. Wird sie nicht durchgeführt, so bedeutet das, dass die Unterlagen, die zur Zulassung vorgelegt werden müssen unvollständig sind und nach § 25 (2) Nr. 1 die Zulassung versagt werden kann. Zuvor waren solche Prüfungen nur für Tierarzneimittel vorgeschrieben. Zu beachten ist weiter, dass diese Regelungen nur neue Arzneimittel betreffen, weshalb bei bisher schon zugelassenen Alt-Arzneimitteln eine solche Umweltverträglichkeitsprüfung nicht durchgeführt werden muss; Erforderlich ist ein solches

Vorgehen also nur bei den Arzneimitteln, für die ab 1998 eine Zulassung beantragt worden ist. Allerdings existieren bis jetzt noch keine verbindlichen Regelungen, wie diese Umweltbewertungen von Humanarzneimitteln durchzuführen sind. Einen Ansatz bietet jedoch eine EMEA-Leitlinie¹⁶ [91], die bisher nur als Entwurf vorliegt, innerhalb des Jahres 2004 in Kraft treten soll, aber dennoch nicht rechtsverbindlich sein wird.

Ob im Falle einer Umweltschädlichkeit eines Mittels, diese als Grund zum Versagen der Zulassung ausreicht, ist umstritten, zumal die deutsche Umsetzung der europäischen Richtlinie nicht den gleichen Wortlaut verwendet. Gemäß Kapitel II Art. 5 der RL 65/65/EWG, in der Änderung durch RL 93/39/EWG [92], wird einem Mittel die Genehmigung „... versagt, wenn sich nach Prüfung der in Artikel 4 angeführten Angaben und Unterlagen ergibt, (...) dass die Arzneyspezialität bei bestimmungsgemäßem Gebrauch *schädlich* ist ...“. Da die Umweltrisikobeschreibung Bestandteil der Prüfungen nach Art. 4 ist, kann man folgern, dass sich der Begriff „schädlich“ auch auf eine Schädigung im Sinne der Umwelt bezieht. Im deutschen Arzneimittelgesetz wird „schädlich“ allerdings in einem anderen Bezug gesehen. Nach AMG § 25 (2) Nr.5 ist eine Zulassung zu versagen, wenn „bei dem Arzneimittel der begründete Verdacht besteht, dass es bei bestimmungsgemäßem Gebrauch schädliche Wirkungen hat, die über ein nach den Erkenntnissen der medizinischen Wissenschaft vertretbares Maß hinausgehen“. Hier wird nur der medizinische Fokus betrachtet und nicht eine Umweltrelevanz, so dass aus ökotoxikologischen Studien nach der nationalen Gesetzgebung kein direktes Versagen einer Zulassung zu folgern ist. Es ist nun fraglich und wird beispielsweise im Bericht des Bund/Länderausschusses für Chemikaliensicherheit BLAC von 1998 zu dem Arzneimittel Clofibrinsäure diskutiert [93], ob ein Versagen nach AMG § 25 (2) Nr. 7 begründet werden kann: „Die zuständige Bundesoberbehörde darf die Zulassung nur versagen, wenn das Inverkehrbringen des Arzneimittels oder seine Anwendung bei Tieren gegen gesetzliche Vorschriften oder gegen eine Verordnung oder eine Richtlinie oder eine Entscheidung des Rates oder der Kommission der Europäischen Gemeinschaften verstoßen würde“. Wenn wirklich eine Nicht-Umweltverträglichkeit als schädlich im Sinne der europäischen RL anzusehen ist, und das Mittel daher nicht rechtskonform ist, so böte AMG § 25 (2) Nr. 7 eine verbindliche Regelung, um die Zulassung auch aus Gründen des Umweltschutzes zu versagen.

¹⁶ EMEA

European Medicines Evaluation Agency; europäische Behörde zur Harmonisierung der Arzneimittelzulassung

Wird eine Schädigung der Umwelt nicht als „schädlich“ im Sinne des Artikels 5 der RL 65/65/EWG angesehen, so wäre daraus zu folgern, dass zwar entsprechende Prüfungen durchgeführt werden müssen, auch, dass gegebenenfalls besondere Kennzeichnungen des Mittels gemacht werden müssen, nicht aber, dass die Zulassung eines Mittels versagt werden muss. Somit wäre die Bedeutung einer solchen Prüfung nur relativ gering.

2.6.2 Veterinärarzneimittel

Veterinärarzneimittel werden in Deutschland ebenfalls durch das AMG [88] und die daraufhin erlassene Arzneimittelverordnung [89] geregelt. Dabei basiert das AMG im Hinblick auf die Tiermedikamente auf der Basis der Richtlinie 81/851/EWG [94]. In der Umsetzung in das AMG wurden sowohl die europäischen Regelungen für Human- als auch Veterinärarzneimittel zusammen behandelt. Daher gelten für beide Bereiche grundsätzlich die gleichen Zulassungsvoraussetzungen; nach § 23 sind aber darüber hinaus noch weitere „Besondere Unterlagen bei Arzneimitteln für Tiere“ beizubringen.

Für Tierarzneimittel gelten ebenso wie bei Humanarzneimitteln die Vorschriften des § 22 (3c), wonach bei der Erforderlichkeit besonderer Vorsichts- oder Sicherheitsmaßnahmen, um *Gefahren für die Umwelt* oder die Gesundheit von Menschen, Tieren oder Pflanzen zu vermeiden, diese Maßnahmen ebenfalls in den Zulassungsunterlagen anzugeben sind. Hier ist also ebenso eine Umweltverträglichkeitsprüfung durchzuführen. Wird dies nicht getan, so sind die Unterlagen nicht vollständig (siehe Angaben zu AMG § 25 (2) Nr. 1, hier in Kapitel 2.6.1), oder das Arzneimittel ist nach dem jeweils gesicherten Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse nicht ausreichend geprüft worden (§ 25 (2) Nr. 2). Sind Prüfungen durchgeführt worden und hat das Arzneimittel nicht vertretbare Auswirkungen auf die Umwelt, so hat das die gleiche Relevanz wie bei den Humanarzneimitteln, nämlich, dass eine Zulassung nicht zwangsläufig versagt werden kann (nur über den fraglichen Brückenschlag der Wortwahl „schädlich“ gemäß der europäischen Richtlinien und nicht des AMG ist evtl. ein Versagensgrund vorstellbar). Folglich hat auch hier die Umweltrelevanzprüfung einen ebensolchen Stellenwert wie bei den Humanarzneimitteln, mit dem Unterschied dass solche Prüfungen bei Veterinärarzneimitteln schon früher als bei Humanmitteln vorgeschrieben waren. Auch wenn die Umweltverträglichkeitsprüfung insgesamt für eine Zulassung nicht unbedingt große Relevanz hat, so ist sie dennoch nicht überflüssig, da beim Vorliegen erforderlicher besonderer Vorsichtsmaßnahmen, diese auf den Behältnissen und Umhüllungen

der Präparate angegeben werden müssen (AMG § 10 (1) Nr. 13, und auch in den Fachinformationen für Ärzte etc. gem. AMG §11 (1) Nr. 16a).

Für Tierarzneimittel gibt es genaue Vorschriften, wie diese Prüfungen gestaltet werden müssen. Der europäische Gesetzgeber hat dies mit der RL 81/852/EWG [95] getan, in der die Angaben zur Prüfung umweltrelevanter Eigenschaften anhand eines Anforderungskatalogs konkretisiert werden. In Deutschland finden sich diese in der Allgemeinen Verwaltungsvorschrift zur Anwendung der Tierarzneimittelprüfrichtlinien vom 20. März 1995¹⁷ [96-98]. Außerdem gibt es von der EMEA eine genaue Anleitung [99] dazu, wie eine solche Prüfung gestaltet werden sollte.

Man muss sich aber in Erinnerung rufen, dass eine entsprechende Prüfung nur für Arzneimittel nötig ist, für die eine Zulassung neu beantragt wird. Für alte, vor dem Jahr 1998 zugelassene Medikamente war eine solche Prüfung nicht notwendig, und braucht für Altarzneimittel auch nicht nachträglich vorgelegt werden.

Eine weitere wichtige Vorschrift für Tierarzneimittel bzw. für die Höchstmengen ihrer Rückstände in Nahrungsmitteln tierischer Ursprungs ist die EU-Verordnung 2377/90 [100]. Darin sind MRL (maximum residue limits), also Höchstkonzentration von Rückständen aus der Verwendung von Tierarzneimitteln für die verschiedenen tierischen Lebensmittel festgelegt. In ihren Anhängen finden sich Verzeichnisse von Stoffen, 1. für die Höchstmengen festgesetzt sind (Anhang I der VO), 2. für die keine Höchstmengen festgesetzt zu werden brauchen, da Rückstände der darin aufgelisteten Stoffe unbedenklich sind und keine Gefährdung des Schutzes der menschlichen Gesundheit darstellen (Anhang II der VO), 3. für die vorläufige Höchstmengen festgesetzt sind (Anhang III der VO), 4. für die keine Höchstmengen festgesetzt werden, da Rückstände des betreffenden Stoffes in Lebensmitteln tierischen Ursprungs in jeder Konzentration eine Gefahr für die Gesundheit des Verbrauchers darstellen (Anhang IV der VO). Diese letzteren Stoffe sind zur Verabreichung an Tiere, die zur Nahrungsmittelerzeugung genutzt werden, verboten. Außerdem ist es gemäß Art. 14 der VO verboten, bei Tieren solche pharmakologischen Stoffe anzuwenden, die nicht in den Anhängen aufgelistet sind. Somit dürfen also als Arzneimittel bei lebensmittelliefernden Tieren nur Wirkstoffe verwendet werden, die sich in Anhang I-III befinden.

¹⁷ AVV

Diese Verwaltungsvorschrift ist eine direkte Umsetzung des Anhangs der RL 92/18/EWG zur Änderung des Anhangs der RL 81/852/EWG, jetzt enthalten in der Richtlinie 2001/82/EWG

Dadurch kann es vorkommen, dass zwar manche Antibiotika gemäß des Anhangs der Arzneimittelverordnung zur Anwendung bei Tieren zugelassen sind, eine Gabe an lebensmittelliefernde Tiere aber durch die VO 2377/90 verboten ist. Solche Stoffe dürfen dann also nur an nicht-lebensmittelliefernde Tiere, z.B. Kleintiere oder Haustiere, angewendet werden. Antibiotika, die aktuell in Deutschland in der tierischen Erzeugung der Landwirtschaft zum Einsatz kommen, sind folglich sowohl in der Anlage der Arzneimittelverordnung, als auch in einem der Anhänge I-III der VO 2377/90 aufgeführt¹⁸. Bei manchen Antibiotika ist eine genauere Betrachtung notwendig, da die AM-VO manchmal nur Oberbegriffe verwendet, wie z.B. bei den Sulfonamiden, die dort ausgedrückt werden als „Sulfanilamid, seine Salze und Derivate, sowie deren Salze“ und keine Einschränkung haben. Das heißt: grundsätzlich ist bei Mensch und Tier eine Anwendung aller Sulfonamid-Antibiotika möglich. Eingeschränkt wird das nur dadurch, dass Arzneimittel gem. AMG zugelassen werden müssen, und bei dieser Zulassung möglicherweise insoweit trennend verfahren wird, dass Humanarzneimittel nur mit anderen Sulfonamiden zugelassen werden, als Veterinärarzneimittel. Eine weitere Einschränkung könnte durch die 2377/90 geschehen, aber auch dort ist in Anhang I ein gemeinsamer Höchstwert für Sulfonamide enthalten. Ein Blick in die Rote Liste und in die Lila Liste zeigt allerdings, dass Sulfamethoxazol nur in Humanpräparaten zu finden ist und in keinem Veterinärarzneimittel, dagegen aber Sulfadimidin nur im Veterinärbereich und nicht in der Humanmedizin. Als weiteres Beispiel seien die Fluorochinolone vorgestellt. Laut AM-VO ist die Ciprofloxacin-Verwendung nicht auf Mensch oder Tier beschränkt, wohl aber die von Enrofloxacin auf Tiere. Gemäß VO 2377/90 ist Enrofloxacin mit MRL aufgeführt, Ciprofloxacin jedoch in keinem der Anhänge, was also die Verwendung bei lebensmittelliefernden Tieren ausschließt. Die Sichtung der Listen ergibt als Ergebnis, dass es von EFL nur Veterinärmittel gibt und von CFL nur Humanmittel.

¹⁸ Vet.-Antib.

fast alle Präparate dieser pharmazeutischen Mittel sind in der aktuellen Lila Liste aufgeführt; sowohl solche für die Anwendung bei Klein- und Haustieren, als auch für lebensmittelliefernde Tiere

2.6.3 Futtermittelzusatzstoffe

Aufgrund der immer geringer werdenden Bedeutung, bis hin zum Verbot ab 2006 [45, 46], soll die rechtliche Situation hier nur überblicksweise beschrieben werden. Futtermittelzusatzstoffe, wie die Leistungsförderer unterliegen in der EU und in Deutschland nicht der Gesetzgebung der Arzneimittel, sondern anderen Bestimmungen, die auf nationaler Ebene Einzug in das Futtermittelgesetz [78] und die Futtermittelverordnung (FMVO) [44] gefunden haben. Dies hat zur Folge, dass sie nicht einer tierärztlichen Verschreibungspflicht unterliegen, sondern einfach erworben werden können. In der Anlage 3 der FMVO sind alle zugelassenen Futtermittelzusatzstoffe genannt, so auch die Antibiotika, die zur Leistungsförderung eingesetzt werden. Da die Stoffe hier nicht durch das AMG geregelt werden, ist auch die Zulassungssituation anders: Für Arzneimittel erfolgt die Zulassung firmenspezifisch und für einzelne Präparate, d.h. auch wenn die gleiche Substanz verwendet wird, so muss ein anderes Präparat mit diesem Wirkstoff extra zugelassen werden. Bei Futtermitteln liegen dagegen generelle wirkstoffbezogene unbefristete Zulassungen für Stoffe vor. Gemäß EU-Recht *müssen* von den Mitgliedsstaaten Zusatzstoffe des Anhangs I der RL 70/524/EWG [101] zugelassen werden, bzw. *können* zugelassen werden (Anhang II). Zur Eintragung in den Anhang I der genannten RL kann ein Stoff aber nur gelangen, „...soweit er bei dem für Futtermittel zugelassenen Gehalt der menschlichen oder tierischen Gesundheit oder der Umwelt nicht schadet...“. Hier gibt es also eine wirkliche Zulassungsbeschränkung, bei Nicht-Umweltverträglichkeit. Die erforderlichen Prüfungen dazu sind in den „Leitlinien zur Beurteilung von Zusatzstoffen in der Tierernährung“ (RL 87/153/EWG) aufgeführt [102]. Dazu gehören z.B. die Untersuchungen der Rückstände in den Ausscheidungen, Persistenz in Gülle, Dung, Streu, Abbau; Persistenz und Eliminationskinetik im Boden, Auswirkungen auf Boden- und Wasserfauna.

Zusammenfassung der bisherigen relevanten rechtlichen Vorschriften

Die Darstellung der rechtlichen Bestimmungen für die verschiedenen Einsatzgebiete der Antibiotika hat gezeigt, dass es keine generelle Trennung der Verwendung von antibiotischen Substanzen gibt. Viele von ihnen können sowohl im Veterinär- als auch im Humanbereich angewendet werden. Manche werden dagegen nur in einem Gebiet eingesetzt, was anhand von verschiedenen Vorschriften und Präparatekatalogen für jede Substanz einzeln geprüft werden muss.

In Bezug auf die Verbreitung von Antibiotika, ihr Erscheinen in und ihre Auswirkungen auf die Umwelt konnte erkannt werden, dass es zwar Umweltverträglichkeitsprüfungen gibt, die einer Zulassung vorausgehen, deren Folgen aber bis auf eventuelle Hinweise und Angaben auf den Mitteln nicht zwangsläufig zu weiteren Konsequenzen, wie z.B. des Versagens einer Zulassung, führen (ausgenommen Futtermittelzusatzstoffe). Darüber hinaus hat die Betrachtung der Zulassungsverfahren und die Sichtung der Rechtstexte ergeben, dass ausgehend von den Ergebnissen aus Umweltverträglichkeitsprüfungen, wie auch immer sie geartet sind, keine Grenzwerte abzuleiten sind, die eine Einschränkung des Gebrauchs (vorstellbar, wenn nach der Zulassung sehr hohe Konzentrationen in der aquatischen Umwelt beobachtet würden) nach sich ziehen. Ist eine Zulassung einmal gewährt worden, so hat die Umweltrelevanz zwar ihre Auswirkung auf die Packungsangaben des Produktes und evtl. auf eine besondere Gebrauchsart; auf neue Entwicklungen und Einflüsse, bedingt durch das Auftreten in der Umwelt, nach normalem routinemäßigem Gebrauch kann sie aber nicht reagieren (z.B. durch Grenzwerte oder weitere beschränkende Maßnahmen)¹⁹.

Die einzigen Grenzwerte betreffen das Vorkommen in Rückständen in Lebensmitteln. Gleichwohl gibt es innerhalb der Umweltverträglichkeitsprüfungen nach EMEA Grenzwerte, bzw. eher Orientierungswerte [91, 99], die in Kap. 2.6.5 noch vorgestellt werden.

2.6.4 Regelungen bzgl. diverser Umweltkompartimente

Es gibt keine rechtlichen Regelungen, die den Gehalt von Arzneimitteln in Abwasser, Oberflächenwasser und Grundwasser betreffen. Gemäß Trinkwasserverordnung [103] gilt jedoch die Anforderung § 6 (1) dass im Wasser für den menschlichen Gebrauch chemische Stoffe nicht in Konzentrationen sein dürfen, die eine Schädigung der menschlichen Gesundheit besorgen lassen. Außerdem sollen nach § 6 (3) „Konzentrationen von chemischen Stoffen, die das Wasser für den menschlichen Gebrauch verunreinigen oder seine Beschaffenheit nachteilig beeinflussen können, (...) so niedrig gehalten werden, wie dies nach den allgemein anerkannten Regeln der Technik mit vertretbarem Aufwand unter Berücksichtigung der Umstände des Einzelfalles möglich ist“. Grenzwerte existieren für Arzneimittel jedoch nicht. Im Wasserhaushaltsgesetz [104] § 7a (1) ist die allgemeine Anforderung für das Einleiten von Abwasser beschrieben: „Eine Erlaubnis für das Einleiten

¹⁹

Evtl. ist eine weiter einschränkende Maßnahme möglich, wenn die Zulassung mit der Auflage verbunden war, dass Gehalte und Effekte in der Umwelt nach normaler Anwendung weiter zu beobachten sind und beim Auftreten von Umweltrisiken, als Folge bestimmte Änderungen im Umgang mit dem Produkt zu erfolgen haben.

von Abwasser darf nur erteilt werden, wenn die Schadstofffracht des Abwassers so gering gehalten wird, wie dies bei Einhaltung der jeweils in Betracht kommenden Verfahren nach dem Stand der Technik möglich ist.“. Außerdem ist nach § 18a (1) Abwasser so zu beseitigen, dass das Wohl der Allgemeinheit nicht beeinträchtigt wird. Inbegriffen in dem Terminus „Abwasserbeseitigung“ und den damit verbundenen Anforderungen ist auch das Oberflächenwasser nach Einleitung von Abwasser. Ferner ist mit der EG-Wasserrahmenrichtlinie [105] als Bewirtschaftungsziel für oberirdische Gewässer in § 25a des WHG die Forderung hineingenommen worden, dass sie so zu bewirtschaften sind, dass 1. eine nachteilige Veränderung ihres ökologischen und chemischen Zustandes vermieden und 2. ein guter ökologischer und chemischer Zustand erhalten oder erreicht wird. Die Abwasserverordnung [106] regelt zwar genauere Anforderungen an die Einleitung von Abwasser (§ 3 in Verbindung mit den Anhängen, z.B. Anh. 1 für kommunales und häusliches Abwasser), gibt aber eher allgemeine Parameter und keine Grenzwerte vor, die pharmazeutische Mittel betreffen. Lediglich aus den speziellen Anforderungen an die chemische Industrie (Anh. 22) wäre mit den Grenzwerten für Giftigkeit (Fisch-, Daphien-, Algengiftigkeit, Bakterienleuchthemmung, etc.) eine Konsequenz für Antibiotika zu ziehen. Der Haupteintragspfad für Antibiotika über das kommunale Abwasser ist hiervon jedoch nicht betroffen.

Grundsätzliche Regelungen zum Boden finden sich im Bundes-Bodenschutzgesetz BBodSchG [107] und der Bundesbodenschutzverordnung BBodSchV [108]. Der § 4 des BBodSchG besagt bezüglich Gefahrenabwehr, dass jeder, der auf den Boden einwirkt, sich so zu verhalten hat, dass schädliche Bodenveränderungen nicht hervorgerufen werden. Gemäß § 7 betrifft das auch die Vorsorge mit der damit verbundenen Vermeidung oder Verminderung von Einwirkungen. In § 12 (2) der BBodSchV ist festgehalten, dass das Auf- und Einbringen von Materialien auf oder in Böden nur dann zulässig ist, wenn die Besorgnis des Entstehens einer schädlichen Bodenveränderung nicht gegeben ist.

Neben diesen allgemeinen Anforderungen finden sich speziellere Regelungen an das Ein- und Aufbringen von Materialien in zwei anderen Verordnungen, die auch in Hinblick auf Antibiotika relevant sind. Sie decken rechtlich die zwei Haupt-Eintragspfade in das Kompartiment Boden ab. Die Ausbringung von Gülle als Wirtschaftsdünger tierischer Herkunft ist in der Düngeverordnung [109] geregelt. Gemäß § 2 (1) Nr. 2 sind Düngemittel (z.B. Gülle, Jauche oder Geflügelkot) so auszubringen, dass „Nährstoffverluste bei der Bewirtschaftung, sowie damit verbundene Einträge in die Gewässer weitestgehend vermieden

werden“. Betreffend Antibiotika und ihrem Eintrag in die aquatische Umwelt ist § 2 (3) relevant und beschreibt genauer: „Beim Ausbringen von Düngemitteln ist im Rahmen guter fachlicher Praxis ein direkter Eintrag in die Oberflächengewässer, unter anderem durch Einhaltung eines ausreichenden Abstandes, oder auf benachbarte Flächen, zu vermeiden und dafür zu sorgen, dass kein Abschwemmen in die Oberflächengewässer oder auf benachbarte Flächen erfolgt.“ Des Weiteren darf die Ausbringung auf Flächen nur dann geschehen, wenn der Boden auch aufnahmefähig dafür ist. Dies ist auch ein Grund dafür, dass Gülle, Jauche und Geflügelkot nach § 3 (4) zwischen dem 15. November und dem 15. Januar nicht ausgebracht werden dürfen. Grenzwerte für Antibiotikagehalte in Düngern oder Böden existieren jedoch nicht.

Das Aufbringen von Klärschlamm auf landwirtschaftlich genutzten Flächen ist nach der Abfallklärschlammverordnung [110] geregelt. Gemäß § 3 (1) hat die Ausbringung so zu erfolgen, dass das Wohl der Allgemeinheit nicht beeinträchtigt wird. Den Gewässerschutz betreffend, darf Klärschlamm nicht in den Zonen I und II von Wasserschutzgebieten, sowie im Bereich von Uferstreifen bis zu einer Breite von 10 m aufgebracht werden (§ 4 (7)). Auch wenn die gesamten Aufbringungsmengen reglementiert sind (§ 6) und strenge Grenzwerte besonders für Schwermetalle existieren, so sind Gehalte von Antibiotika oder anderen Pharmazeutika nicht geregelt.

2.6.5 Umweltverträglichkeitsprüfung

Zur Überprüfung der Umweltverträglichkeit von Veterinärarzneimitteln, die gemäß Arzneimittelgesetz bzw. der RL 2001/82/EWG vorgeschrieben ist, sind die Vorgaben der EMEA-Leitlinie [99] sehr hilfreich. Sie ist aufgebaut auf einem Zweiphasensystem [93, 111]. In Phase I wird geschaut, welche und wie viele Tiere wie oft behandelt werden, wie die Applikation geschieht, mit welchen Konzentrationen in der Gülle gerechnet wird, ob ein Abbau nach Gülleapplikation erfolgt, ob ein direkter Eintrag von Weidetieren geschehen kann. Stoffe, die nur sehr geringe mengenmäßige Bedeutung haben, werden auch nur geringe Umweltauswirkungen haben und müssen deshalb nicht weiter überprüft werden. Zentrale Frage der Phase I Prüfung ist, wie hoch die rechnerisch abgeschätzte Umweltkonzentration eines Stoffes ist (PEC²⁰). Diese Abschätzung berücksichtigt die Behandlungsrate, die Besatzdichte, den Abbau, Gülleproduktion, maximale Ausbringung pro Jahr, Pflugtiefe. Ergibt sich, dass der PEC-Schwellenwert von 100 µg Wirkstoff/kg Boden überschritten wird,

²⁰ PEC

predicted environmental concentration

so muss die Prüfung nach Phase II fortgesetzt werden. Weitere Gründe, die zur Phase II führen, sind die Überschreitung des PEC für Grundwasser von 0,1 µg/L, wenn in Aquakulturen PEC von mind. 1 µg/L auftreten oder, wenn es sich um Antiparasitika handelt. In Phase II wird nun die genaue PEC mit den niedrigsten Wirkkonzentrationen aus verschiedenen ökotoxikologischen Tests verglichen. Dazu werden mit dem zuzulassenden Präparat Tests bezüglich Giftigkeit gegenüber Daphnien, Bodenmikroorganismen, Algen, Erdwürmern und Pflanzen durchgeführt. Anschließend werden je nach Test die effektive Dosis₅₀, die letale Dosis₅₀, bzw. minimale Hemmkonzentrationen oder PNEC-Werte²¹ bestimmt und auf den PEC bezogen. Ist z.B. das Verhältnis PEC/PNEC > 1, so sind weitere und genauere Berechnungen und Tests zu Exposition und Effekten erforderlich. Bleibt danach das Verhältnis weiterhin über 1, so sind verbunden mit der Zulassung des Mittels gewisse Maßnahmen erforderlich, die bei der Anwendung des Präparates beachtet werden müssen, um das Umweltrisiko abzuschwächen. Solche Maßnahmen können z.B. darin bestehen, dass behandelte Tiere nicht in die Nähe von Oberflächengewässern gelangen dürfen, dass Gülle, die Rückstände des Mittels enthält, vor der Ausbringung eine gewisse Lagerungsdauer aufweisen muss, oder dass nur eine bestimmte Menge der Gülle pro Fläche ausgebracht werden darf.

²¹ PNEC

predicted no effect concentration, abgeschätzte Konzentration, die sicher keine Effekte mehr auslösen kann; berechnet ausgehend von der PNOEC predicted no-observed effect concentration, also der Konzentration, bei der kein sichtbarer Effekt gefunden werden konnte und die durch einen Sicherheitsfaktor von meist 100 dividiert wurde

2.7 Eintrag von Antibiotika in die Umwelt

Ansatzweise wurde in den vorherigen Kapiteln schon auf die Eintragspfade eingegangen, die hier näher beleuchtet werden sollen. Bedingt durch die Anwendungsarten, sind auch für den Eintrag in die Umwelt verschiedene Varianten zu berücksichtigen (siehe Abb. 8) [14, 15, 18, 19, 112].

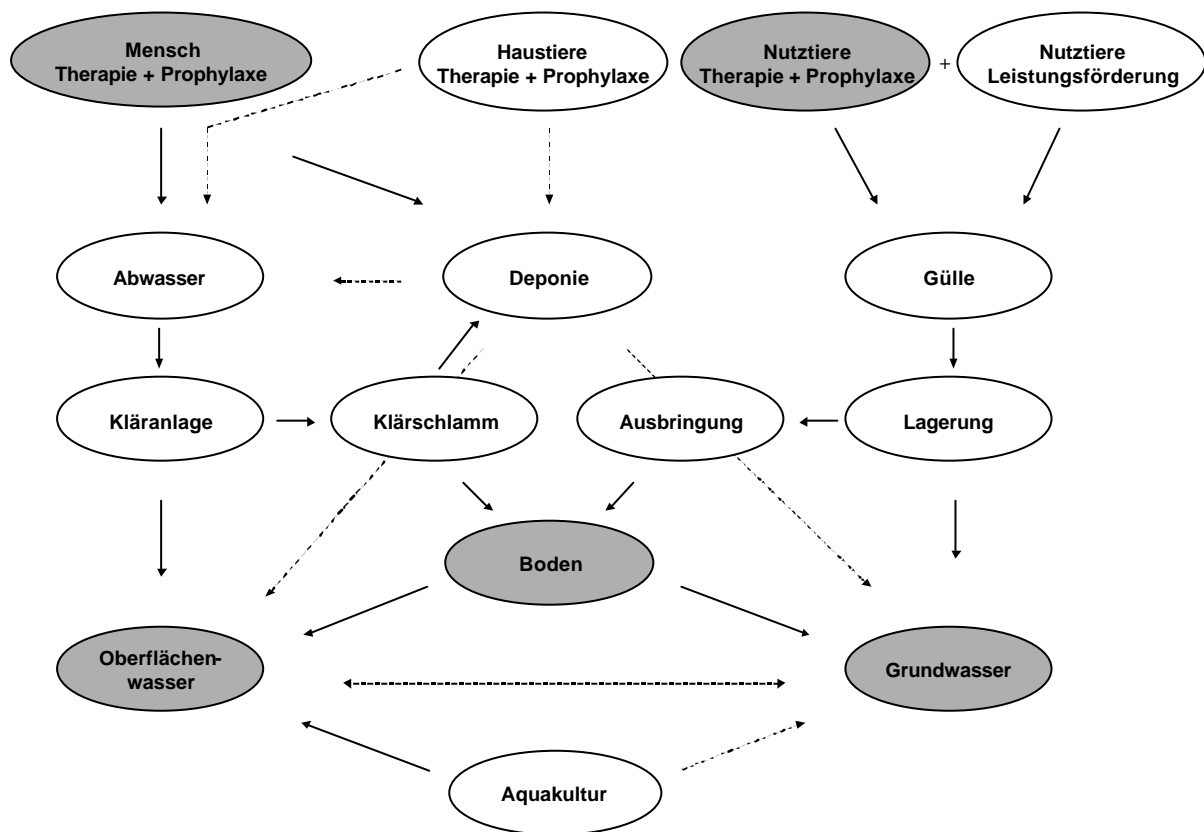


Abbildung 8: *Eintragspfade von Antibiotika*

grau hinterlegt sind die wichtigsten Anwendungen und die Umweltkompartimente

2.7.1 Eintrag von Humanpharmaka

2.7.1.1 Körperpassage

Nach der oralen oder parenteralen Verabreichung unterliegen Antibiotika dem körpereigenen Metabolismus, durch den die Substanzen je nach chemischer Eigenschaft mehr oder weniger gut ab- bzw. umgebaut werden. Wie Hirsch et al. beschreiben [15], kann dies dazu führen, dass manche Substanzen zu 85 % metabolisiert werden und nur 15 % der Ursprungssubstanz in Urin oder Faeces zu finden sind (Sulfamethoxazol). Andere hingegen, wie z.B. Amoxicillin oder Doxycyclin gelangen hauptsächlich in unveränderter Form aus dem Körper und liegen nur in Anteilen von 10-20 % in Form ihrer Metaboliten vor [113]. Manche (z.B. Tetracycline) können aber auch zum Großteil im Körper verbleiben und in Gewebe oder Knochensubstanz eingebaut werden, was auf die Bindung an zweiwertig positiv geladene Ionen, wie Calcium zurückzuführen ist [114-116]. Die Konzentrationen, die nach der Körperpassage in den Ausscheidungen auftreten können, sind zum einen bedingt durch die therapeutischen Dosen und zum anderen durch die jeweiligen Abbauraten. Nach sechstägiger Anwendung von Trimethoprim oder Doxycyclin fanden Hoeverstadt et al. (in [15]) in menschlichen Faeces Konzentrationen zwischen 3 und 40 mg/kg, von Erythromycin sogar 200-300 mg/kg.

Bei topisch applizierten Mitteln ist der Abbau geringer als nach oraler oder parenteraler Anwendung. Da sie äußerlich auf die Haut aufgetragen werden, unterliegen sie nur bedingt dem körpereigenen Metabolismus. Denkbar ist bei ihnen höchstens ein Abbau durch die Mikroflora der Haut, der aber geringer ausfallen dürfte, als wenn die Substanzen den spezialisierten metabolen Prozessen des Körpers unterworfen werden, die auf enzymatischer Spaltung, Glycosylierung, Acetylierung oder Hydrolyse beruhen [1, 117, 118].

2.7.1.2 Eintrag ins Abwasser

Mit dem Abwaschen der topisch applizierten Präparate von der Haut, was vor jeder erneuten Auftragung geschehen soll, tritt der Wirkstoff via Waschwasser direkt in den Abwasserpfad ein [119]. Im Körper angewandte Pharmazeutika bzw. deren Rückstände und Metaboliten werden mit den Ausscheidungen nach der Körperpassage über die Toiletten ins Abwassernetz eingetragen. Üblicherweise erfolgt dabei eine starke Verdünnung. Als Abwassermenge pro Person und Tag werden im Durchschnitt 150 L angenommen (siehe [85], oftmals werden 200 L veranschlagt, was aber für die deutschen Verhältnisse etwas zu viel ist [91, 120]). Mit einer solchen Abwassermenge werden die Ausscheidungen von 2-3 kg pro Person und Tag

folglich 50-75fach verdünnt. Aus Konzentrationen in Faeces behandelter Personen im zweistelligen mg/kg-Bereich resultieren dann Konzentrationen im Abwasser solcher Patienten im Bereich von mehreren Hundert µg/L bis in den unteren mg/L-Bereich.

Ein weiterer Eintrag ins Abwasser kann durch die nicht-fachgerechte Entsorgung nicht-genutzter Medikamente erfolgen, sofern sie direkt in die Toiletten geworfen werden. In einem solchen Fall erfolgt ein plötzlicher Eintrag hoher Mengen, durch den reiner unmetabolisierter Wirkstoff eingetragen wird. Würde von einer Person nur eine Tablette mit Ciprofloxacin (500 mg, siehe Tabelle 2) auf diese Weise entsorgt, so wäre die Konzentration im Abwasser des gesamten Tages dieser Person im Durchschnitt mehr als 3 mg/L.

2.7.1.3 Abwasserleitung

Die häuslichen Abwässer sind die Haupt-Entsorgungswege eingenommener Medikamente. Mit der Vermischung des genutzten Wassers der einzelnen Haushalte erfolgt eine Verdünnung kontaminierter Partien mit unbelasteten. Je nach Erkrankungssituation der Bevölkerung sind die Konzentrationen in den gesammelten Abwässern höher oder niedriger. Nimmt bei einer Bevölkerung von eintausend Personen eine einzelne Antibiotika ein, so reduziert sich die Konzentration vom einstelligen mg/L-Bereich des einzelnen Haushaltsabwassers auf Konzentrationen im einstelligen µg/L-Bereich im gesammelten.

Besonders exponierte Einzelabwässer können auch von Krankenhäusern stammen, in denen zum Teil eine erhöhte Anwendung von Antibiotika erfolgt (siehe Tab. 5). Untersuchungen von Krankenhausabwässern im Auftrage des Landesumweltamtes Nordrhein-Westfalens belegten, dass im gesammelten Abwasser eines Universitätsklinikums Konzentrationen vieler verschiedener Antibiotika im µg/L-Bereich auftreten, mit Spitzenkonzentrationen von Piperacillin von 26 µg/L, Sulfamethoxazol von 17 µg/L oder Ofloxacin von 24 µg/L [121]. Die Messungen erfolgten dabei per LC-MS/MS nach vorheriger Reinigung und Aufkonzentrierung durch Festphasenextraktion. Mithilfe dieses LC-MS/MS Verfahrens konnten 29 verschiedene Antibiotika untersucht und durch Aufnahme von Tochterionenspektren identifiziert werden.

Die vereinigten Haushalts-, sowie Krankenhausabwässer, sofern sie nicht über eigene Entsorgungs- oder Behandlungssysteme verfügen, gelangen über die Abwasserleitungen als Zuläufe zu den kommunalen Abwasserbehandlungsanlagen (Kläranlagen). Die Abwasser-

mengen eines Klinikums mit großer Bettenzahl sind dabei nicht unerheblich und können einen starken Einfluss auf die Antibiotika-Konzentrationen im Kläranlagenzulauf haben.

In das System der Kanalisation gelangen neben den verschiedenen Einleitungen von genutztem Wasser meist auch Zuläufe aus Niederschlagswasser:

Verfügt eine Gemeinde über eine Mischkanalisation, so wird bei Regenereignissen das Wasser von versiegelten Flächen abgeschwemmt, in das gleiche Kanalsystem, wie das häusliche Abwasser, eingeleitet und bewirkt eine Verdünnung der Kläranlagenzuläufe [122]. Im Normalfall wird das Regenwasser mit dem Abwasser dann zusammen geklärt. Ist das gesamte transportierte Volumen im Kanal jedoch so hoch, dass eine Überlastung der Kläranlage erfolgen würde, so kann es zur „Entlastung“ kommen, indem ein Teil des Volumens nicht der Kläranlage zugeführt wird, sondern direkt einem Vorfluter. Dabei würde auch ein Teil des Abwasser ungeklärt in die Oberflächengewässer gelangen.

Bei einer Trennkanalisation bestehen zwei unabhängige Systeme: in einem wird das häusliche, gewerbliche und ggfls. industrielle Schmutzwasser transportiert, in einem anderen das Wasser aus Niederschlägen. Das erstere wird zur Kläranlage geleitet, das andere direkt in einen Vorfluter. Dabei erreicht Wasser von versiegelten Flächen (möglicherweise verunreinigt) direkt ein Oberflächengewässer.

2.7.1.4 Behandlung des Abwassers

In der Kläranlage beruht die Behandlung des Abwassers je nach Ausbaustufe auf verschiedenen Schritten und umfasst im Idealfall neben einer mechanischen Klärung (Grobrechen, Sandfang), eine biologische Reinigungsstufe (mit Belebtschlammverfahren und Denitrifikation), sowie eine chemische Stufe (Fällung, Oxidation). Während dieser Verfahren erfolgt zwischen dem Zulauf und dem Ablauf eine Reduzierung der Schadstofffrachten (auch der Pharmaka). Abhängig ist die Eliminationsleistung dabei von den angewandten Verfahren, sowie von den Wirkstoffen, was zu erheblichen Unterschieden führen kann. Werden bei manchen durch Veränderung des Moleküls, entweder durch mikrobiellen Abbau, oder durch Veränderungen wie Oxidationen oder Reduktionen tatsächlich hohe Abbauraten oder nahezu komplette Eliminationen von mehr 99 % erreicht, so ist es möglich, dass andere nur durch Adsorption an Festpartikel aus der Wasserphase entfernt werden und wieder andere nahezu unverändert bleiben. Die in den Abläufen auftretenden Konzentrationen der verschiedenen Wirkstoffe können daher in einem weiten Bereich liegen.

- Verhalten von Pharmaka im Kläranlagenprozess -

a) leicht abbaubare Stoffe

Besonders hohe Abbauraten werden in Kläranlagen von Penicillinen erreicht, so diese Substanzen überhaupt die Kläranlage als intakte Moleküle mit dem Abwasser-Zulauf erreichen. Grund ist die leichte Hydrolysierbarkeit (auch schon von Tyczkowska et al., sowie Myllyniemi et al. beschrieben [123, 124]), die vor allem unter dem Einfluss von β -Lactamasen von Mikroorganismen erfolgt und welche die Aufspaltung des β -Lactamringes zur Folge hat. Die offenkettigen Metaboliten haben in dieser Form keine antibiotische Wirkung mehr. Da gerade in Abwasser und in Belebungsbecken von Kläranlagen sehr hohe Keimzahlen vorliegen, können in den Abläufen und den Vorflutern kaum mehr intakte Muttersubstanzen von Penicillinen gefunden werden. Hirsch et al. [15] fanden nach Lyophilisation und Messung per LC-MS/MS (Bestimmungsgrenze = 20 ng/L) weder Rückstände von Penicillinen in Kläranlagenabläufen, noch in Oberflächenwasser. Auch der Bund/Länder Ausschuss Chemikaliensicherheit (BLAC) konnte in einem umfangreichen Messprogramm Penicilline nach SPE-Behandlung und Messung per LC-MS/MS nur sehr selten und in sehr geringen Konzentrationen (maximal 150 ng/L Amoxicillin) in Kläranlagenabläufen finden [85]. Wenn dennoch gewisse, wenn auch geringe Gehalte zu finden sind, so liegt das zum einen daran, dass die Einsatzmengen von Amoxicillin die höchsten aller Antibiotika in Deutschland sind, dass auch bei hohen Abbauraten Einträge in die Gewässer geschehen können, zum anderen aber daran, dass sie, wie Flucloxacillin zu den penicillinasefesten β -Lactamantibiotika gehören und daher etwas schwerer abgebaut werden.

Nicht zu den Antibiotika gehörend, aber sehr leicht abbaubar ist auch Coffein, welches in Berliner Kläranlagenzuläufen in Konzentrationen bis zu 640 $\mu\text{g/L}$ gefunden wurde, in Abläufen aber höchstens bis zu 3 $\mu\text{g/L}$. Die Abbaurate beträgt mehr als 99,9 % [125].

b) adsorbierbare Stoffe

Eine Substanz, die im Kläranlagenprozess weniger eine Veränderung des Molekül-Gerüsts erfährt, als vielmehr durch Adsorption an Feststoffmatrix aus der Wasserphase entfernt wird, ist das Fluorochinolon Ciprofloxacin. Golet et al. [126] fanden, dass es zu mehr als 90 % durch Adsorption an die Schlammphase aus dem Abwasser entfernt wird, und dass der biologische Abbau nur eine untergeordnete Rolle spielt (Messung der wässrigen Proben nach Festphasenextraktion an einem Kationen-Austausch-Material per HPLC mit Fluoreszenzdetektion; Messung der Schlämme nach ASE-Extraktion und Festphasenextraktion ebenfalls

per HPLC mit Fluoreszenzdetektion). Die Konzentrationen im Schlamm erreichten von Ciprofloxacin 1,7-3,5 mg/kg, von Norfloxacin 1,7-3,3 mg/kg. In einer anderen Untersuchung schweizerischer Kläranlagenabläufe [127] fanden sie Gehalte von Ciprofloxacin in Höhe von 250-405 ng/L. Deutlich zu erkennen ist die Eliminationsleistung für Fluorochinolone im Kläranlagenprozess in Studien, in denen Zuläufe und Abläufe untersucht werden. Alexy et al. [128] beprobten eine Kläranlage mit ca. 8.000 angeschlossenen Einwohnern, konnten aber bilanzierte Werte in Zuläufen und Gehalte in Abläufen für Ciprofloxacin analytisch nicht bestätigen. Obwohl 25 ng/L bilanziert worden waren, lagen die Konzentrationen in der Wasserphase unter der Nachweisgrenze. Hingegen im Belebtschlamm und im Überschussschlamm konnte CFL im zweistelligen µg/kg-Bereich nachgewiesen werden, was für die starke Sorptionsfähigkeit von Vertretern dieser Substanzklasse spricht. Ebenso konnte auch Norfloxacin und Enoxacin nicht in der Wasserphase, wohl aber im Beleb- und Überschussschlamm (bis 380 bzw. 140 µg/kg) gefunden werden. Ofloxacin konnte zum Teil auch im Zulauf (bis 220 ng/L), sowie im Ablauf (bis maximal 200 ng/L) und ebenfalls in den Schlammarten gefunden werden.

In der Studie des BLAC wurden in Abläufen Höchstgehalte von 190 ng/L Ofloxacin bzw. 144 ng/L Ciprofloxacin gemessen, was aber deutlich unter den Gehalten anderer Antibiotika, wie Sulfonamide oder Makrolide liegt, die bis zu Gehalten von wenigen µg/L nachweisbar waren. Ähnlich sieht die Eliminationsleistung von Tetracyclinen aus, die in einer Untersuchung von Hirsch et al. [15] in keinem der untersuchten Kläranlagenabläufe (BG = 50 ng/L) Gehalte finden konnten. Dies ist wahrscheinlich begründet durch die Bildung stabiler Komplexe mit zweiwertigen Kationen, wie Calcium oder Magnesium, die auch für den Einbau in Knochensubstanz verantwortlich ist (siehe Kap. 2.7.1.1) [129-131]. Dieser Prozess der Komplexbildung wird im Kläranlagenprozess, sowie später auch in den Vorflutern und weiterführenden Gewässern durch Adsorption der Tetracycline an Sedimentschichten oder an andere Feststoffe fortgesetzt [130]. Liegen sie dann gebunden vor, so ist es zwar möglich, dass sie durch das darüber liegende Wasser wieder herausgewaschen werden können, aber gemäß ihren $K_{d, \text{Boden}}$ - bzw. ihren K_{OW} -Werten [131] liegen sie doch lieber in der Festphase vor. Somit ist anzunehmen, dass Tetracycline, wenn sie noch im Zulauf enthalten sind, durch Adsorption eine Reduzierung der Gehalte in der Wasserphase erfahren und im Ablauf- und Oberflächenwasser daher nur noch ein Bruchteil zu finden ist.

c) schwer und mittelschwer abbaubare Stoffe

Stoffe deren Eliminationsrate im Kläranlagenprozess nur sehr gering ist, sind von den nicht-Antibiotika beispielsweise Ibuprofen, Diclofenac oder Carbamazepin, die zu 80-100 % unverändert durch die Kläranlage gelangen, wie Heberer et al. in einer Untersuchung aus Berlin herausfanden [125]. Im BLAC Untersuchungsprogramm lagen aber auch die Mediane der Konzentrationen von Sulfamethoxazol, Trimethoprim oder Roxithromycin in den Kläranlagenzu- und -abläufen auf der gleichen Höhe, so dass diese anscheinend in geringerem Maße abgebaut werden, als manch andere Stoffe. Die Konzentrationen im Zulauf erreichten dabei von Sulfamethoxazol als Median 390 ng/L (max. 9 µg/L) und von Trimethoprim 65 ng/L (max. 0,4 µg/L), im Ablauf, mit einem Median von 330 ng/L Sulfamethoxazol und 100 ng/L Trimethoprim (max. 4,7 µg/L bzw. 1,5 µg/L) nicht zwangsläufig weniger. Sie können daher als gut mobil gelten, zumal sie nur eine geringe Sorptionsaffinität an Feststoff- und Bodenpartikel haben [131]. Nach Alexy et al. [128] wurden Gehalte an Sulfamethoxazol im Zulauf von 220-660 ng/L (Trimethoprim 110-330 ng/L) und im Ablauf von 170-370 ng/L Sulfamethoxazol (Trimethoprim 3-38 ng/L) gefunden. Dass hierbei anscheinend andere Abbauraten erreicht werden, kann daran liegen, dass die beobachtete Kläranlage über eine andere Klärleistung verfügt, als die im BLAC-Programm untersuchten. Erschwerend für die Bestimmung der Abbauleistung kommt hinzu, dass innerhalb der Kläranlagen eine zeitliche Verzögerung zwischen Eintritt und Austritt durch die Klärung des Wassers auftritt, und es in den Becken auch zur Vermischung unterschiedlich kontaminierten Zulaufwassers kommen kann, weshalb Proben nur bedingt miteinander zu vergleichen sind.

Von Makroliden und Lincosamiden können die Konzentrationen in den Kläranlagenabläufen ebenso, wie z.B. bei Sulfamethoxazol gesehen, nahezu die gleiche Höhe erreichen, wie in den Zuläufen. So lagen in der Untersuchung von Alexy et al. [128] die Konzentrationen von Roxithromycin in Zuläufen zwischen 26 und 130 ng/L, in Abläufen zwischen 53 und 83 ng/L. Die Gehalte von Clarithromycin und Clindamycin lagen in einem ähnlichen Bereich, Erythromycin jedoch in den Zuläufen sogar 120-550 ng/L, in Abläufen 71-400 ng/L. Ähnliche Gehalte fanden auch McArdell et al. [132] in Abläufen, die nach Festphasenextraktion der Proben an einer Polymerphase und einer RP-18-Phase per LC-MS/MS bestimmt wurden: Clarithromycin bis zu 330 ng/L, Roxithromycin bis zu 31 ng/L und Erythromycin bis 220 ng/L. Letzteres lag allerdings nur in einer der drei untersuchten Kläranlagen über der Bestimmungsgrenze. Aus den Konzentrationen und den Abwasservolumina konnten Frachten berechnet werden, die in die Vorfluter eingeleitet werden. Diese

emittierten Frachten betragen von der Kläranlage Kloten-Opfikon (26.000 Anlieger) 1,7-2,9 g Erythromycin pro Tag und 1,2-2,7 g Clarithromycin pro Tag. In den anderen Kläranlagen mit 276.000 bzw. 35.000 Anwohnern, wurde zwar Erythromycin nicht gefunden, dafür aber Clarithromycin mit 26-58 g/Tag bzw. 0,8-2,4 g/Tag. Dass hier so große Unterschiede zwischen dem Auftreten von Erythromycin und Clarithromycin bestehen, liegt daran, dass in der Schweiz der durchschnittliche Konsum von Erythromycin nur ca. 24 mg/Person im Jahr beträgt, von Clarithromycin jedoch 254 mg/Person. Im Vergleich dazu werden in Deutschland, ausgehend von Tab. 6, 175-237 mg Erythromycin pro Person und Jahr verschrieben. Die für die Schweiz ungewöhnlich hohen Frachten an ERY in Kloten waren weniger bedingt durch den Konsum der Schweizer, als vielmehr durch den Flughafen und die internationalen Fluggäste, in deren Heimatländern deutlich mehr ERY pro Person konsumiert wird.

Mit den geklärten Abwässern gelangen die, in der Wasserphase gelösten oder an Kolloide adsorbierten, nicht abgebauten Rückstände, sowie die Metaboliten, über die Vorfluter in die aquatische Umwelt.

2.7.1.5 Entsorgung der Klärschlämme

Auch die aus der Wasserphase entfernten Rückstände, wie z.B. manche Fluorochinolone, die gebunden an Belebtschlamm vorliegen, können in die Umwelt gelangen. Eine gewisse Reduzierung der Gehalte kann noch während der Faulprozesse in den Faultürmen der Kläranlagen geschehen. Anschließend gelangen die Klärschlämme zur Entsorgung entweder auf Deponien oder zur Verbrennung.

Bei der Verbrennung erfolgt eine vollständige Zerstörung und Entfernung von Rückständen. Dies ist bei der Deponierung nicht der Fall, hier kann nur im Laufe der Zeit ein Abbau vonstatten gehen. Ein unkontrollierter Austrag von Schadstoffen oder von Pharmakarückständen ist bei modernen Deponien im Normalfall nicht möglich, da sich durch die Basisabdichtung und Sickerwasserfassungen Einträge z.B. in das Grundwasser vermeiden lassen. Statt dessen werden Deponiesickerwässer gesammelt und einer Klärung zugeführt. Bei älteren Deponien könnte es denkbar sein, dass durch Leckagen eine Beeinflussung des Bodens, des Grundwassers oder des Oberflächenwassers geschieht.

Ebenfalls auf die Deponie können Antibiotikamengen gelangen, die über den Hausmüll entsorgt werden. Dieser Anteil kann ganz erheblich sein, da laut Althaus [1] nur bis zu 30 %

der verschriebenen Medikament nach Vorschrift des Arztes eingenommen werden und ein gewisser Teil einfach über den Hausmüll entsorgt wird.

Eine Untersuchung des BLAC zeigte [85], dass erhebliche Konzentrationen von Arzneimitteln in Deponiesickerwässern auftreten können, die bis zu wenigen $\mu\text{g/L}$ reichen, z.B. Clofibrinsäure bis max. $3,5 \mu\text{g/L}$, Dimethylaminophenazon $1,5 \mu\text{g/L}$. Antibiotika waren allerdings nur selten zu finden, bis max. $0,7 \mu\text{g/L}$ Dehydrato-Erythromycin oder $0,35 \mu\text{g/L}$ Sulfamethoxazol. Werden die Sickerwässer aber ordnungsgemäß zu Kläranlagen abgeleitet, so unterliegen dort die Rückstände einem erneuten Abbau.

Eine weitere Möglichkeit der Entsorgung von Klärschlämmen ist die Verwendung als Dünger in der Landwirtschaft, welche auch zu einem Eintrag von Humanantibiotika in die Umwelt führen kann [13]. Dabei können Böden, Grund- und Oberflächenwasser in der gleichen Art beeinflusst werden, wie bei der Verwendung kontaminierter Gülle zur Düngung (zur näheren Beschreibung dieses Eintrags, siehe Kapitel 2.7.2).

2.7.1.6 Eintrag in die Oberflächengewässer

Die Einleitung aus einer Kläranlage in Oberflächengewässer kann entweder kontinuierlich geschehen, oder chargenweise. Aus ersterer ergibt sich ein gleichmäßiger Anteil an Abwasser in dem Vorfluter, aus letzterer eine Stoßbelastung mit kurzzeitig sehr hohem Abwasseranteil. Ist der Vorfluter sehr klein und mit nur geringem Wasserabfluss, so können auch dort noch Konzentrationen von Antibiotikarückständen auftreten, die ähnlich denen des Abwassers sind. Fließt dieser Vorfluter in ein anderes Gewässern, so ergeben sich mit dem Verdünnungseffekt entsprechend niedrigere Konzentrationen.

Dies fanden auch Hirsch et al., die Gewässer im hessischen Raum untersuchten [15]. Ein kleiner Bach im ländlichen Raum zeigte dort die höchsten Konzentrationen an Antibiotika, die sich in den nachfolgenden Gewässern mit steigendem Wasserabfluss stetig erniedrigten. Die Ursache für die hohen Konzentrationen von bis zu $1,7 \mu\text{g/L}$ ERY oder $0,56 \mu\text{g/L}$ Roxithromycin war der hohe Anteil von kommunalem Abwasser in dem Bach. Meist lagen die Konzentrationen in diesem Gewässeruntersuchungsprogramm allerdings deutlich niedriger. Bei einer Bestimmungsgrenze von 20 ng/L (Tetracycline 50 ng/L) konnten nach hundertfacher Anreicherung (nach Lyophilisation) per LC-MS/MS von den 18 Antibiotika nur sechs verschiedene in den Proben nachgewiesen werden. Weder Tetracycline, noch Penicilline waren zu finden, sondern nur Makrolide, Chloramphenicol und die beiden Wirkstoffe des Cotrimoxazols[®]. Das 50 Percentil betrug von Sulfamethoxazol 140 ng/L ,

Trimethoprim 90 ng/L, Roxithromycin 200 ng/L, Clarithromycin 150 ng/L und Dehydrato-Erythromycin 630 ng/L. Auch Ternes [18] berichtet vom Vorkommen von humanpharmazeutischen Wirkstoffen (keine Antibiotika) in Oberflächengewässern im Bereich bis 2 µg/L, die mit den Kläranlagenabflüssen eingetragen werden. Meist liegen die Konzentrationen aufgrund des Verdünnungseffektes jedoch im Bereich weniger hundert ng/L. Bei Lindsey et al. [22], die Oberflächengewässer in den USA beprobten, lagen die Konzentrationen von Sulfonamiden ebenfalls meist in diesem Bereich, einmal sogar bis maximal 15 µg/L. Es konnten auch die Tetracycline Chlortetracyclin, Oxytetracyclin und Tetracyclin bis 1,3 µg/L nachgewiesen werden (Messung per LC-MS/MS nach Anreicherung an HLB-SPE-Säulen, einem Material mit polaren und unpolaren Anteilen). Sacher et al. [133] untersuchten ebenfalls Oberflächengewässer auf Sulfamethoxazol und Trimethoprim und fanden sie im Bereich zwischen 25 und 163 ng/L bzw. 6,6 und 24 ng/L. Im Jahr 2002 veröffentlichten Kolpin et al. [134] eine der bis dahin größtangelegten Studien zum Vorkommen von Pharmaka in Fließgewässern der USA. Darin zeigten sie, dass es eine gewisse Beziehung zwischen den Konzentrationen in den Gewässern und der Anzahl an Kläranlageneinleitungen gibt. Die Konzentrationen von Sulfamethoxazol lagen im Median (von 104 Proben) bei 0,15 µg/L, maximal 1,9 µg/L, andere Sulfonamide deutlich darunter, von Dehydrato-Erythromycin im Median bei 0,1 µg/L, maximal 1,7 µg/L, Chlortetracyclin 0,42 µg/L (max. 0,69 µg/L), Lincomycin 0,06 µg/L (max. 0,73 µg/L). Die Bestimmung erfolgte dabei, im Anschluss an die Anreicherung durch SPE mit HLB Material und einem Kationen-Austausch Material, per LC-MS. In einer deutschlandweiten Studie des BLAC [85] in der 136 repräsentative Oberflächenwasserproben auf Antibiotika untersucht wurden, konnte Sulfamethoxazol in 82 Proben (bis 377 ng/L), Trimethoprim in 63 (bis 170 ng/L), Clarithromycin in 48 (bis 950 ng/L), Dehydrato-Erythromycin in 65 (bis 460 ng/L) und Roxithromycin in 46 (bis 60 ng/L) nachgewiesen werden. Dabei konnte eine Korrelation zwischen dem Borgehalt, als Indikator für Einleitungen aus Kläranlagen, und den Konzentrationen von Antibiotika festgestellt werden. In exponierten Oberflächenwasserproben, die stärker anthropogen beeinflusst sind, war Sulfamethoxazol bis 550 ng/L bestimmbar, Trimethoprim bis 190 ng/L, ERY bis 290 ng/L, Roxithromycin bis 560 ng/L.

2.7.2 Eintrag von Veterinärpharmaka und Leistungsförderern

2.7.2.1 Körperpassage

Nach der oralen Verabreichung unterliegen Tierarzneimittel (und Leistungsförderer) den gleichen Abbaumechanismen im Körper, wie dies beim Menschen der Fall ist. Der Abbau ist dabei je nach Substanz unterschiedlich stark. Auch hier beruhen die metabolen Prozesse auf enzymatischer Spaltung, Glycosylierung, Acetylierung, Hydrolyse, etc.

Die Konzentrationen, die sich nach der Anwendung in den Ausscheidungen nachweisen lassen, liegen in einem ähnlichen Bereich, wie beim Menschen, da auch die therapeutischen Dosen pro kg Körpergewicht etwa gleich hoch sind. Wie in Kapitel 2.4.2 erwähnt, betragen diese Mengen zur Infektionsbehandlung bei landwirtschaftlichen Nutztieren zwischen 20-40 (Ampicillin) und 50-100 (Sulfadimidin) mg/kg KGW/d. Die Behandlung einer Zuchtsau mit 120 kg KGW oder einer Milchkuh mit ca. 500 kg KGW erfordert daher eine Absolutmenge von 2.400 bzw. 10.000 mg AMP pro Schwein bzw. Kuh oder 6.000 bzw. 25.000 mg SDM. Bezogen auf eine Gesamtausscheidung von 40 kg pro Tag und Kuh (20 kg Festmaterial + 20 l Flüssigkeitsausscheidung), ergeben sich in den Exkrementen Maximalkonzentrationen von 250 mg/kg Ampicillin oder 625 mg/kg Sulfadimidin. Je nach Abbau im Körper liegen die Konzentrationen jedoch deutlich darunter. In den Schweineausscheidungen ergäben sich (unter Berücksichtigung der Aufnahme von 2-4 kg fester Nahrung und 8-10 l Trinkwasser, gesamt etwa 12 kg Gesamtausscheidungen) Konzentrationen von 200 (AMP) bzw. 500 mg/kg (SDM) beim behandelten Tier.

2.7.2.2 Lagerung der Gülle

Erfolgt in landwirtschaftlichen Betrieben die Lagerung und Sammlung von Gülle, so werden die Exkremente der verschiedenen einzelnen Tiere zusammen aus dem Stallsystem abgeschwemmt und über Leitungs- oder Abflusssysteme einem Behältnis zur Lagerung zugeführt. Dadurch werden kontaminierte Ausscheidungen von behandelten Tieren mit solchen von unbehandelten Tieren vermischt. Unter der Annahme, dass im Durchschnitt stets eines von 50 Tieren behandelt wird (entweder als einzelnes krankes Tier, oder im zeitlichen Mittel bei Behandlung des Bestandes), ergeben sich aus 500 mg Sulfadimidin pro kg Ausscheidung beim einzelnen Tier maximale Konzentrationen von 10 mg SDM pro kg in der

Gülle²². Bei häufigerer Behandlung wäre mit entsprechend mehr zu rechnen. Durch zusätzliches Wasser, welches zur Stallreinigung oder zur Spülung des Leitungssystems unter den Spaltenböden verwendet wird, oder welches zugesetzt wird, um die Gülle pumpfähig zu machen, wird die Gülle noch weiter verdünnt, so dass mit Gehalten im einstelligen mg/L-Bereich gerechnet werden kann.

Die Lagerung von Gülle, Jauche, Dung oder Stallmist erfolgt in Tanks oder Behältnissen. In den USA werden bei Großbetrieben oftmals sogar Gülleseen angelegt, sogenannte „hog lagoons“. Diese liegen als große offene Flächen inmitten der Landschaft.

Während der Lagerung kann mit der Zeit ein gewisser Abbau vonstatten gehen, der aber nicht zwangsläufig ist, zumal üblicherweise keine weitere Behandlung der Gülle geschieht. Bei manchen Antibiotika konnte erkannt werden, dass aus den im Tierkörper gebildeten Metaboliten während der Güllelage wieder die Ausgangssubstanzen zurückgebildet werden können [135, 136]. Langhammer [117] zeigte, dass bei dem, aus Sulfadimidin entstandenen, Hauptmetaboliten N-4-Acetylsulfadimidin, ohne besondere Behandlung der Gülle, eine Deacetylierung erfolgte und die ursprüngliche Wirksubstanz resultierte.

Hamscher et al. [129] untersuchten gemischte Schweinegülle eines Schweinemastbetriebes und fanden nach flüssig/flüssig-Extraktion mit Ethylacetat und Messung per LC-MS/MS 4 mg/kg Tetracyclin, Chlortetracyclin hingegen nur zu 0,1 mg/kg. Deutlich geringere Gehalte wurden für Tiamulin und Salinomycin in Schweinegülle von Schlüsener et al. [137] mit 0,04 bzw. 0,01 mg/kg gefunden (flüssig/flüssig-Extraktion mit Ethylacetat, Reinigung an Diol-SPE-Phase und Messung per LC-MS/MS), was aber auf die geringe Stabilität dieser Substanzen zurückzuführen ist, da 100fach höhere Werte erwartet worden waren. Im BLAC-Untersuchungsprogramm lagen die Gehalte an SDM in Schweinegülle bei bis zu 2,9 mg/L. Tetracyclin konnte hingegen sogar bis zu 45,3 mg/L gefunden werden, meist aber im einstelligen mg/L-Bereich (Bestimmung mit der Methode nach Hamscher et al.). Haller et al. berichten, ebenfalls nach flüssig/flüssig-Extraktion und LC-MS/MS Bestimmung, über gesamt-Sulfonamidgehalte in Schweinegülle von bis zu 20 mg/L, Sulfadimidin alleine bis 8,7 mg/kg, Sulfathiazol bis 12,4 mg/kg [138]. Eine Beprobung von „hog lagoons“ in den USA mit Messung per Radioimmunoassay nach Verdünnung bzw. per LC-MS nach SPE-Reinigung an C18-Material, zeigte Tetracyclin-Rückstände im Bereich mehrerer hundert µg/L, bis max. 870 µg/L, so Meyer et al. [139].

²² SDM in Gülle

Die 10 mg/kg basieren darauf, dass kein Abbau stattgefunden hat.

2.7.2.3 Eintrag in Boden

Im Veterinärbereich gibt es zwei Bereiche, die zum Eintrag von Antibiotika in den Boden führen können:

- direkter Eintrag durch Weidevieh
- Eintrag durch Gülleausbringung

Werden mit Antibiotika behandelte Tiere nicht im Stall, sondern auf Weiden gehalten, so kann mit den Ausscheidungen ein direkter Eintrag auf den Boden geschehen. Die örtlichen Konzentrationen können dabei sehr hoch liegen, besonders bevor eine Auswaschung geschieht.

Bei Stallhaltung und Sammlung der anfallenden Ausscheidungen als Mist oder als Gülle, erfolgt zumeist die Verwendung dieser Stoffe als Dünger. Stallmist wird dazu direkt in den Boden eingearbeitet. Gülle wird entweder mit Hilfe von Schleppschläuchen oder mittels Streuteller auf landwirtschaftlich genutzte Flächen ausgebracht. Dabei erfolgt in der Regel eine gleichmäßige Verteilung. Teilweise kann aber auch hier nicht ganz vermieden werden, dass lokal mehr ausgebracht wird und es an vereinzelt Stellen zu Pfützenbildungen kommt, die durch Eintrocknung dann sogenannte „hot spots“ darstellen können.

Hamscher et al. [129] konnten in getrockneten Güllekrusten an der Bodenoberfläche Tetracyclin-Gehalte von bis zu 349 µg/kg und Chlortetracyclin-Gehalte von bis zu 1435 µg/kg bestimmen (flüssig/flüssig-Extraktion mit Ethylacetat, Messung per LC-MS/MS). In Boden, der mit Antibiotika-haltiger Gülle gedüngt und auch gepflügt worden war, konnte Tetracyclin bis 199 µg/kg und Chlortetracyclin bis 7 µg/kg innerhalb der obersten 30 cm bestimmt werden. Eine Verlagerung in tiefere Schichten fand nicht statt. Aus der Untersuchung dieses Bodens über ein Jahr konnte gefolgert werden, dass sogar eine Akkumulation von Antibiotika stattfindet.

Im BLAC-Programm [85] wurden Böden untersucht, auf die Schweinegülle ausgebracht worden war. Diese Böden enthielten bis zu 185 µg/kg Tetracyclin und bis zu 17 µg/kg Chlortetracyclin. Mit Mischgülle (Rind/Schwein) gedüngter Boden enthielt beide Tetracycline nur zu 5-6 µg/kg. In Boden, der mit Geflügelmist oder mit Gülle aus der reinen Milchviehhaltung gedüngt worden war, lagen keine bestimmbar Konzentrationen vor.

Höper et al. berichten von Böden in denen nach Gülle-Ausbringung 11 µg/kg Sulfadimidin gefunden wurden [140].

2.7.2.4 Eintrag in Gewässer

Ein Eintrag von Veterinärantibiotika in Gewässer kann auf drei verschiedene Arten erfolgen:

1. Direkteintrag
2. Oberflächenabfluss
3. Versickerung

Direkteintrag

Bei der Weidehaltung von behandeltem Vieh ist es möglich, dass neben Böden auch Gewässer beeinflusst werden. Sofern beispielsweise eine Absperrung nicht vorhanden oder nur ungenügend ist, ist durchaus mit einem direkten Eintrag in Bäche oder Entwässerungsgräben zu rechnen.

Während der Gülleausbringung zu Düngezwecken kann ebenfalls ein Direkteintrag in Oberflächengewässer geschehen. Dies ist z.B. dann der Fall, wenn bei der Ausbringung mittels Streuteller ein zu geringer Abstand zum Gewässer eingehalten wird und direkt Gülle hineingelangt. Auch durch das Überfahren kleiner Abflussgräben kann ein Gewässer durch Gülle beeinflusst werden. Als weitere Möglichkeit ist die Gefahr der Verwehung während der Ausbringung zu betrachten.

Leckagen von Gülletanks oder tropfende Ausbringungsbehälter sind Ursache eines anderen möglichen Eintrages. Damit kann, während der Fahrt zur Fläche, die gedüngt werden soll, ein Tropfverlust auf Straßen und somit ein Eindringen ins Kanalsystem oder direkt in ein Gewässer verbunden sein. Auch durch Abwaschen des Ausbringungsgeräts kann eine Kontamination von Wasser oder Gewässern erfolgen. Der Bonner Generalanzeiger berichtet in seiner Ausgabe vom 01.08.2003 von einem Fall, als durch ein defektes Ventil eines Güllebeckens Hunderte Liter Jauche von Schweinen und Puten unbemerkt ausgelaufen und direkt in die Swist gelangt sind [141].

Oberflächenabfluss

Ist ein Eintrag in den Boden geschehen (entweder durch Gülleausbringung oder bei Beweidung), so kann bei großer Aufwandmenge und entsprechendem Gefälle ein Eintrag in Gewässer erfolgen, auch wenn gemäß Düngeverordnung dafür Sorge zu tragen ist, dass kein solches Abschwemmen in Oberflächengewässer erfolgt. Ein oberirdischer Abfluss ist besonders dann begünstigt, wenn die Art des Bodens die rasche Aufnahme verhindert. Dies ist auch bei einem wassergesättigten Boden der Fall. Ebenso kann eine ausgetrocknete Bodenkruste die Aufnahme erschweren, bzw. leicht zu einem Abfluss führen.

Starkregenereignisse tragen zusätzlich dazu bei, dass ausgebrachte Gülle oder Boden abgeschwemmt wird und eine Kontamination der Gewässer geschieht, wie Ternes [18] oder Hirsch et al. [15] berichten. In gleicher Weise kann ein Eintrag durch Hochwasserereignisse mit Überschwemmungen von landwirtschaftlichen Flächen geschehen. Durch das abfließende Wasser wird ein Eintrag dann noch unterstützt.

Versickerung

Antibiotikarückstände können bei dünnflüssiger Konsistenz der Gülle in tiefere Bodenschichten eindringen. Begünstigt wird dieser Vorgang durch Regenereignisse während oder nach Gülleapplikation, wodurch ein Auswaschen der Substanzen geschieht. Je nach Bodenbeschaffenheit (z.B. Bindungsfähigkeit) und Substanz (Hydrophilie) kann dadurch sogar ein Eintrag ins Grundwasser geschehen [22, 137]. Huysman et al. konnten diesen Weg anhand von Tetracyclin-resistenten Bakterien aufzeigen. Nachdem in Schweinegülle und Rinderdung solche Bakterien nachgewiesen werden konnten, wurden auch in Boden, auf den solche Gülle ausgebracht war, resistente Bakterien erkannt, nicht aber in Boden, der nicht so gedüngt worden war. Sogar in 1 m Tiefe lebten noch solche Bakterien. Das Grundwasser unter diesen landwirtschaftlichen Flächen enthielt ebenfalls resistente Bakterien [142]. Ebenso wie die Bodenart und das Bodengefüge spielt auch das Vorkommen von Makroporen eine Rolle für den Eintrag ins Grundwasser, wie Thiele-Bruhn beschreibt [83]. Durch Makroporen und durch präferentielle Flüsse können sogar Stoffe mit hoher Bindungsaffinität zum Boden (z.B. Tetracycline) das Grundwasser erreichen. Über den Zwischen- oder Unterbodenabfluss sind auch diffuse Einträge in Oberflächenwasser möglich.

Solche Mechanismen, sowie weitere umfangreiche Erkenntnisse zum Eintrag von Stoffen aus der Anwendung in der Landwirtschaft, zur Verlagerung und zum Einfluss auf Grund- und Oberflächenwasser wurden in der Vergangenheit speziell schon für die Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmittel erkannt und beschrieben [143-146].

Für die Pharmaka zeigten Untersuchungen von Hirsch et al. [15], dass in Grundwässern, unter landwirtschaftlich genutzten Flächen, begründet durch das Auftreten von Sulfadimidin (bis 150 ng/L), eine Beeinflussung durch die landwirtschaftliche Praxis erfolgt. In Oberflächenwasser konnte Sulfadimidin hier hingegen nicht erkannt werden. Sacher et al. [133] fanden in einem Monitoringprogramm von 105 Grundwassermessstellen nur in einer einzigen Probe Sulfadimidin mit 23 ng/L, häufiger jedoch die Humanantibiotika Sulfamethoxazol und Dehydrato-Erythromycin (nach SPE per LC-MS/MS). Hamscher et al. [129], die den Eintrag von Antibiotika aus Gülle über den Boden in Grundwasser verfolgten, bestimmten Tetracyclinegehalte in den ersten beiden Matrices, konnten aber weder Tetracycline noch Tylosin im Grundwasser nachweisen.

Die Messungen von repräsentativem und exponiertem Grundwasser im BLAC-Programm [85] erbrachten keine Gehalte vom Veterinärantibiotikum Sulfadimidin, sondern nur von Antibiotika, die im Humanbereich angewendet werden²³. In den Untersuchungen von 136 Proben repräsentativer Oberflächengewässer konnten jedoch Veterinärantibiotika gefunden werden. Hier war in 18 Proben Sulfadimidin bestimmbar (in 16 von 18 Proben < 50 ng/L, Maximalwert 145 ng/L). Die Konzentration des 90-Perzentil lag bei 5 ng/L. In exponierten Oberflächenwasserproben war es nicht nachweisbar.

2.7.2.5 weitere Formen des Eintrags

Zur Fischzucht können in Aquakulturen Antibiotika eingesetzt werden. Dabei werden die Stoffe direkt in das Wasser gegeben. Üblicherweise liegen solche Becken in direkter Nähe zu einem Fließgewässer. Bei einer Behandlung der Fische wird das Antibiotikum direkt in das Wasser hineingegeben. Besteht eine Anlage aus Überlaufsbecken, bedeutet das, dass mit dem zu- und abströmenden Wasser ein Teil der Antibiotikamenge stetig in das Oberflächengewässer eingetragen wird. Wird nicht im Überlaufbetrieb gearbeitet, so kann es nach einer Antibiotikabehandlung bei einem kompletten Beckenwasseraustausch zu einem plötzlichen hohen Eintrag kommen (zur Untersuchung solcher Gewässer siehe [47]).

²³ Grundwässer

Von den Humanantibiotika wurden folgende Maximalkonzentrationen gefunden: Sulfamethoxazol bis 350 ng/L, Trimethoprim 23 ng/L, Dehydrato-Erythromycin 700 ng/L, Clarithromycin 43 ng/L, Roxithromycin 34 ng/L.

Die Behandlung mit Antibiotika im Klein- und Haustierbereich kann ebenfalls zu einem Eintrag in die Umwelt führen.

Durch die Verwendung von Veterinärantibiotika in tierärztlichen Praxen können Reste in das Abwassersystem gelangen und damit den gleichen Prozessen unterliegen, wie die im Abwasser vorhandenen Humanantibiotika. Vom Tier aufgenommene Wirkstoffe gelangen nach Passage durch den Körper zunächst nicht in dieses Netz:

Je nach Tierart erfolgt entweder eine Entsorgung von Ausscheidungen über den Hausmüll und dessen Deponierung, oder keine eigentliche Entsorgung, sofern Ausscheidungen direkt auf Böden, Straßen etc. gelangen. Mit solchen Verunreinigungen ist ein Eintrag von Veterinärpharmaka in das Abwassernetz möglich, wenn mit einer Mischkanalisation bei Regenereignissen auch das Wasser von versiegelten Flächen zu Kläranlagen gelangt [122]. Liegen Trennsysteme vor, in denen das Wasser von Straßen und Plätzen direkt in ein Gewässer eingeleitet wird, so erfolgt keine Gehaltsminderung in Kläranlagen. Statt dessen gelangen die Rückstände in den Ausscheidungen komplett in die aquatische Umwelt (lediglich verdünnt durch das Niederschlagswasser).

2.7.3 Hydrogeologische und künstliche Mechanismen des Eintrags

Ist ein Eintrag in Oberflächenwasser geschehen, so kann dadurch auch das Grundwasser belastet werden. Einerseits ist dies über die künstliche Grundwasseranreicherung in Rieselfeldern möglich [125, 147], andererseits über die direkte Beziehung zwischen den Wasserkörpern durch Passage durch das Sediment (Infiltration), wie Verstraeten et al. anhand von Herbiziden zeigen konnten [148].

Heberer berichtet über das Berliner Gewässersystem, bei dem stark anthropogen belastetes Oberflächenwasser zur Grundwasseranreicherung genutzt wird. Während der Bodenpassage erfolgt nur ein teilweiser Abbau der Rückstände von Pharmaka, so dass in den Grundwässern Konzentrationen verschiedenster Stoffe bis zu wenigen $\mu\text{g/L}$ vorliegen²⁴ [125].

²⁴ belastetes GW

Das künstlich angereicherte Grundwasser wird in Berlin teilweise zur Trinkwassergewinnung verwendet. Aufgrund der hohen Konzentrationen von Arzneimittelrückständen in diesem Rohwasser ist eine vollständige Eliminierung während der Trinkwasseraufbereitung nicht gewährleistet, so dass z.B. schon Konzentrationen von mehr als 100 ng/L Clofibrinsäure oder 105 ng/L N-(Phenylsulfonyl)-sarcosin im Trinkwasser gefunden wurden.

Der umgekehrte Weg der Gewässerbeeinflussung ist ebenfalls möglich: liegt eine Belastung des Grundwassers vor, so kann mit Variierung des Grundwasserpegels auch ein Ausgleich/Austausch mit dem Oberflächenwasser geschehen [144, 145]. Allerdings wird die Verlagerung der Substanzen, was die Passage zwischen Wasserkörpern, aber auch innerhalb des Bodens betrifft, durch die Stärke und die Zusammensetzung der Boden-/Sedimentschicht behindert und bei manchen Stoffen mit starken Komplexbindungsfähigkeiten sogar verhindert [83, 131].

2.8 Abschätzung der Umweltkonzentrationen

2.8.1 Humanarzneimittel

Über die in Kapitel 2.7.1 beschriebenen Pfade erfolgt ein Eintritt von Antibiotika-Rückständen in die Umwelt. Die zu erwartenden, sowie bisher in der Literatur zu findenden Konzentrationen im *Abwasser* resultieren dabei aus den Verbrauchsmengen (unter Berücksichtigung der Abbauraten), der Abwassermenge und dem Abbau im Kläranlagenprozess. Abschätzungen lassen sich nach Datenvorlage entweder regional begrenzt machen, so dass einzelne besondere Situationen erfasst werden können, oder aber als Bundesdurchschnitt unter Verwendung der gesamtdeutschen Verbrauchsmengen, sowie mittlerer Abbauraten und gemittelter Abwassermengen. Entsprechende Abschätzungen wurden z.B. vom BLAC gemacht [85], oder von der CPMP oder von Halling-Sørensen et al. [120] beschrieben. Oft ist in der so erhaltenen durchschnittlichen Konzentration im Abwasser jedoch ein Abbau im Körper nicht berücksichtigt. Unter zusätzlicher Verwendung der Metabolismusrate im Körper, die für jeden Stoff einzeln ermittelt werden muss, lässt sich ein genauerer Wert für das Abwasser vorhersagen. Wird der Abwasseranteil innerhalb eines Fließgewässers in die Berechnung mit einbezogen, kann eine Vorhersage über die Konzentration im Oberflächenwasser getroffen werden. Allerdings wird dabei nicht berücksichtigt, dass bei manchen Stoffen auch eine Rückbildung des Ausgangsstoffes aus den Metaboliten erfolgen kann, oder dass ein weiterer Abbau auch innerhalb des Gewässers stattfinden kann.

Gleichung 1: *Formel zur Abschätzung der Umweltkonzentration von Stoffen im Kompartiment Abwasser (Kläranlagenzulauf)*

$$\text{PEC}_{\text{KA-Zu}} [\mu\text{g/L}] = \frac{\text{Gesamtjahresverbrauch [kg/Jahr]} \cdot (100 - \text{Eliminierung [\%]}) \div 100 \cdot 10^9}{\text{Abwasser pro Einwohner} \cdot 365 [\text{d}] \cdot \text{Einwohner in D} \cdot \text{Verdünnung [L/d]}}$$

Als Abwassermenge werden 150 L pro Einwohner und Tag angenommen (siehe [85], oftmals werden aber auch 200 L veranschlagt, was aber für die deutschen Verhältnisse etwas zu viel ist [91, 120]). Die gesamte Bevölkerungszahl in Deutschland lag zum Dezember 2002 bei 82,5 Mio. Einwohnern [149]. Bei Abwasser wird ein Verdünnungsfaktor von 1 verwendet.

Zur Berechnung von Konzentrationen im Ablaufwasser der Kläranlage muss der PEC (Abwasser) noch mit der Abbaurrate innerhalb der Kläranlage verrechnet werden, zur Berechnung von Oberflächenwasserkonzentrationen zusätzlich der Anteil an Abwasser im Gewässer:

Gleichung 2: *Formel zur Abschätzung der Umweltkonzentration von Stoffen im Kompartiment Oberflächenwasser*

$$\text{PEC}_{\text{OW}} [\mu\text{g/L}] = \frac{\text{PEC}_{\text{KA-Zu}} [\mu\text{g/L}] \cdot (100 - \text{Kläranlagenabbau [\%]}) \div 100}{\text{Verdünnung}}$$

Anhand der abgeschätzten Jahresaufwandmengen gemäß Tabelle 6 und Literaturdaten bzgl. Metabolisierung [15, 113, 118, 150] lassen sich Konzentrationen im Abwasser (Kläranlagenzulauf), dargestellt in Tabelle 7, berechnen. Unter Annahme einer durchschnittlich 50 %igen Abbauleistung von Kläranlagen [127, 128, 151, 152] (für Ciprofloxacin und Trimethoprim lagen genauere Literaturdaten vor) und einem Anteil von etwa 10 % Abwasser in Oberflächengewässern, erhält man folgende PEC verschiedener Antibiotika:

Tabelle 7: PEC verschiedener Humanantibiotika in Kläranlagenzuläufen, -abläufen und Oberflächengewässern (Abwasseranteil 10 %)

	Abbau-Körp. [%]	Abbau-KA [%]	PEC _{KA-Zu} [µg/L]	PEC _{KA-Ab} [ng/L]	PEC _{OW} [ng/L]
Amoxicillin*	20		12,8-28,0		
Ciprofloxacin	30	80	1,1	217	22
Clindamycin	70	50	0,5-1,9	232-266	23-27
Erythromycin	40	50	1,9-2,5	930-1262	93-126
Penicillin V*	60		6,0		
Sulfamethoxazol	80	50	1,8-2,2	868-1107	87-111
Trimethoprim	20	25	1,6-1,9	399-487	40-49

* Penicilline sind luftempfindlich und können leicht abgebaut werden; besonders bei Anwesenheit von Bakterien gelingt eine leichte Aufspaltung des β -Lactamringes [15, 121, 123]. In Untersuchungen von Kläranlagen-Zu- und -Abläufen konnten sie fast nie gefunden werden, da wahrscheinlich ein starker Abbau direkt nach der Körperpassage im häuslichen Abwasser stattfindet. Die angegebenen Konzentrationen in Kläranlagen-Zuläufen werden daher in Proben nicht unbedingt vorkommen, sondern stellen eher maximale Werte dar.

Bei den Berechnungen der PEC für Antibiotika, die auch dermal angewendet werden, sind die Abbauraten im Körper auch für den topisch applizierten Anteil berücksichtigt worden, da dieser ohnehin deutlich weniger als 10 % der gesamten verordneten Menge ausmacht.

Die Konzentrationen (bundesweiter Jahresdurchschnitt), die sich im Oberflächenwasser finden lassen, liegen somit im unteren ng/L-Bereich bis zu wenigen Hundert ng/L. Ist der Abwasseranteil in einem Oberflächengewässer höher, so schlägt sich das entsprechend erhöhend auf den PEC_{OW} aus. In Kläranlagenzuläufen liegen die Konzentrationen dagegen bei wenigen µg/L. Nicht berücksichtigt in den Berechnungen ist die Möglichkeit, dass sich Ursprungssubstanzen aus den Metaboliten wieder zurückbilden können, weshalb einzelne Konzentrationen auch höher als hier angegeben ausfallen dürften.

2.8.2 Veterinärpharmaka

Genauere Daten über die Jahresaufwandmengen von Veterinärantibiotika sind für Deutschland nicht zu erhalten (siehe Kapitel 2.5). Abschätzungen der Umweltkonzentrationen können daher nicht über eine mittlere Gesamtverbrauchsmenge angestellt werden, sondern müssen ausgehend von der Behandlung des einzelnen Tieres geschehen. In Kapitel 2.7.2.1 und 2.7.2.2 wurde berechnet, wie hoch die Antibiotika-Konzentrationen in den Ausscheidungen von behandelten Tieren sein können und, dass je nach Gesundheitszustand, die Konzentrationen in der Gülle unterschiedlich hoch sind. Bei einer durchschnittlichen Behandlung von zwei Prozent der Tiere konnte eine Sulfadimidin-Belastung von 10 mg/L in Gülle berechnet werden, woraus sich nach Verdünnung der gesammelten Gülle durch Reinigungswasser 5 mg/L als realistischere Konzentration ergeben. Die Verwendung solcher Gülle als Dünger auf Böden, mit üblichen Ausbringungsmengen von 20-40 m³/ha (= 2-4 L/m²) [153, 154], kann bei einmaliger jährlicher Applikation zu einem Eintrag von 10-20 mg/m² führen, bei häufigerer Düngung zu entsprechend mehr. Ohne weitere Verlagerung und bei einer üblichen Pflugtiefe von 30 cm [153, 154] bedeutet dies eine Kontamination von 300 L Boden (Dichte = 1,5 kg/L), also 450 kg, woraus sich Konzentrationen im µg/kg Bereich ergeben (20-40 µg/kg). Erfolgt kein Auswaschen der Substanzen, so ist darüber hinaus, bei weiterer Düngung mit kontaminierter Gülle, mit einer Akkumulation zu rechnen.

In Güllekrusten an der Bodenoberfläche ist mit noch höheren Konzentrationen zu rechnen, so dass lokal ebenso wie in Gülle mg/kg an Substanz erreicht werden können. Zu ähnlichen Konzentrationen kann auch der mögliche Eintrag durch Beweidung mit behandelten Tieren führen, wodurch u.U. (sofern erkrankte Tiere nicht im Stall bleiben) hochbelastete Ausscheidungen mit Rückständen in Höhe von wenigen Hundert mg/L direkt unverdünnt auf den Boden gelangen.

Allerdings ist nach dem Eintrag, wie auch immer er erfolgt ist, eine Verringerung der Substanzen im Boden durch Abbau, Verlagerung oder Adsorption möglich. Die Vorhersage von Gehalten in Oberflächen- oder Grundwasser, bedingt durch die Ausbringung von Gülle, ist aufgrund der vielen Einflussfaktoren (Art der Substanz, geländespezifische Gegebenheiten, Ausbringungsart, Bodenart, Temperatur, Niederschläge, etc.) sehr komplex. Mit verschiedenen Modellierungsprogrammen kann versucht werden, solche Einträge abzuschätzen, eine genaue Prognose ist aber nur schwer möglich.

Dass ein Eintrag von Veterinärpharmaka in Gewässer aber stattfinden kann, und durchaus zu beträchtlichen Konzentrationen führt, soll nochmals mit Hinweis auf Kap. 2.7.2 erwähnt werden.

Zusammengefasst ist durch die Verwendung von Antibiotika im Human- und Veterinärbereich mit einem Eintrag von Rückständen und Metaboliten in die Umwelt zu rechnen. Dieser kann im Oberflächenwasser zu Konzentrationen im **ng/L**-Bereich führen, je nach Eintragssituation auch zu höheren Konzentrationen. In Gülle sind Konzentrationen im unteren **mg/L**-Bereich zu erwarten, in Kläranlagenzuläufen im unteren **µg/L**-Bereich, und in mit Gülle behandeltem Boden im Bereich einiger **µg/kg**.

3. Material, Methoden und Methodenentwicklung

3.1. Material

3.1.1 Geräte

3.1.1.1 Flüssigchromatographie, HPLC

Quartenäre Pumpe, Serie HP 1050	Hewlett-Packard
Variabler UV-Wellenlängendetektor, Serie HP 1050	Hewlett Packard
Probengeber, Serie HP 1100	Hewlett Packard
Thermostatisierter Säulenraum, Serie HP 1100	Hewlett Packard
Interface 35900	Hewlett Packard
Software HP ChemStation für LC	Hewlett Packard
Säule: Micro 2 MZ-PBM, C18, 3,0 µm (250 x 2,1 mm)	MZ Analystechnik
Säule: Spherisorb ODS II, C18, 5,0 µm (250 x 4 mm)	Bischoff Chromatography
1,5 mL Schraubgewinde-Probenflaschen, dunkel, 32 x 11,5 mm	Alltech Associates, Inc.
Teflon/Silikon Septen + 08/425 PP Schraubkappe mit Loch	Alltech Associates, Inc.

3.1.1.2 Festphasenextraktion

Vakuumkammer mit 16fachem Aufsatz	Alltech Associates, Inc.
Auslassnadeln aus Teflon	Alltech Associates, Inc.
Durchflusshähne	Carl Roth GmbH & Co.
Schläuche , 1/8 `` OD Teflon Tubing	Alltech Associates, Inc.
Adapter für Säulen, Teflon	Alltech Associates, Inc.
LiChrolut [®] EN (40-120 µm), Best. Nr.: 1.19853.0020	Merck
ISOLUTE [™] ENV+ 200 mg/6 mL Part. No.: 915-0020-C	Separis
ENVI-Chrom P 250 mg/6 mL, Part. No.: 57225-U	Supelco ²⁵
Chromabond EASY 200 mg/3 mL Art. Nr.: 730.754	Macherey-Nagel
SepPak [®] RP18 1000 mg Vac 6cc Part. No.: Wat 036905	Waters
BakerBond C18 Polar Plus, Part. No.: 7465-00	J. T. Baker
Strata SDBL-L 200 mg/3 mL Part. No. 8B-S014-FBJ-S	Phenomenex [®] Ltd.
Strata X 200 mg/6 mL Part. No. 8B-S100-FCH	Phenomenex [®] Ltd.

3.1.1.3 Filtration

Selectron Glas-Vakuum-Filtrationsgerät GV 100	Schleicher&Schuell GmbH
Membranfilter ME 25, 0,45 µm Mischester, Ref. No. 10401621	Schleicher&Schuell GmbH
Glasfaserfilter GF 8 Rundfilter Ø 10 cm, Ref. No. 370120	Schleicher&Schuell GmbH
Faltenfilter 615 1/4, Ø 18,5 cm, 85 g/m ² Art. Nr. 431018	Macherey-Nagel GmbH
GHP Acrodisc [®] 13 mm, 0,2 µm Membran Prod. No 4554T	Gelman Lab., Pall Corp.
Injekt-F 1 mL Feindosierungsspritze, Ref. No. 9166017 V	Braun Melsungen AG
100 Sterican Ø 1,20 x 40 mm Einmalkanüle, Ref. No.4665120	Braun Melsungen AG
Sephadex [™] PD 10 columns G25-M Part. No.: 17-0851-01	Amersham Biosciences

3.1.1.4 Beschleunigte Lösemittlextraktion

ASE [®] 200 Extraktor	Dionex
Solvent Controller für ASE [®] 200 Extraktor	Dionex
11 mL Stahl-Extraktionszellen, Part. No. 049560	Dionex
Glasfaserfilter GF 51 RF, Ø 19,1 mm, Ref. No. 10428146	Schleicher&Schuell GmbH
Hydromatrix, Isolute [®] HM-N, Part. No. 9800-1000	Separis
40 mL Clear Collection Vials, Part. No. 048783	Dionex
Lids for Collection Vials, Part. No. 049463	Dionex
Teflon-Silicon Septa, Part. No. 049464	Dionex

3.1.1.5 ELISA

8-Kanal Microplate Washer FlexiWash	Asys HiTech GmbH
Vmax [®] Kinetic Microplate Reader	Molecular Devices Corp.
Software: Softmax [®] Pro for Windows [®]	Molecular Devices Corp.
THERMOstar ⁺ Microplate Incubator/Shaker	BMG LabTechnologies
Tischzentrifuge Z 200 M/H	Hermle Labortechnik
Elektronikrührer Multipoint HP 15	H+P Labortechnik GmbH
Mikrotiterplattenschüttler	VEB MLW Prüfgerätewerk
MS2 Minishaker	IKA [®] Works Inc.
Flaschenaufsatzdispenser Varipenser plus 4961 25 bzw. 50 mL	Eppendorf AG
Multipette [®] plus	Eppendorf AG
Combitips [®] plus 1,0 mL und 0,5 mL (0030 069.234 bzw. .226)	Eppendorf AG
Varipette [®] 4810 0,5-10 µL, 10-100 µL, 200-1000 µL, 500-2500 µL	Eppendorf AG
Reference [®] variabel 100-1000 µL	Eppendorf AG
epT.I.P.S. Standard 0,5-10 µL, 10-100 µL, 200-1000 µL,	Eppendorf AG

2500 µL (Ord. No. 0030 000.811, .870, .919, .951)
 8-Kanal Proline[®] Electronic Pipettors 1200
 Biohit Proline Tip 1200, Cat. No. 780046
 Mikrotiterplatten, ImmunoPlate F 96 Cert. Maxisorp
 MµLTITM Twist Top Conical Vials + Caps
 (Prod. Nr. 15630 + 15490)
 MµLTITM Reaktionsgefäße 0,65 mL (Best. Nr. 7060-1)
 Safe-Lock Tubes 2,0 mL (Ord. No. 00,0 120.094)
 Cryovial[®] Sterile 4 mL (Prod. Nr. T310-4A)
 Parafilm[®]
 Flasche G10, braun mit Teflonseptum (Art. Nr. 300110)

Biohit Oyj
 Biohit Oyj
 NuncTM Brand Products
 Carl Roth GmbH & Co

 Carl Roth GmbH & Co.
 Eppendorf AG
 Simport Plastics Ltd.²⁶
 PechinayPlastic Packag.²⁷
 CS-Chromatographie Serv.

3.1.1.6 Sonstiges

Ultraschallbad Sonorex Super RK102H
 MilliQPlus 185
 SLS 02 Evaporator
 16-Positionen Rack
 Heizrührer IKA-Combimag RCT
 pH-Papier Tritest pH 1-11
 pH-Meter MP 220
 Überkopf-Schüttler Reax 20
 Pflanzeisen, Gärtnereibedarf, Grabtiefe 15 cm
 1 L Weck-Gläser, Tulpenfrom
 2,5 L Braunglasflaschen mit Teflonseptum

Bandelin Elektronik
 Millipore
 SLS Färber-Skutlarek GbR
 Eigenkonstruktion
 Janke & Kunkel
 Macherey-Nagel
 Mettler-Toledo
 Heidolph
 Knauber
 Weck GmbH
 div. Lösemittellieferanten

²⁶ Cryovial

erhältlich über Carl Roth GmbH & Co

²⁷ Parafilm

erhältlich über Carl Roth GmbH & Co

3.1.2 Chemikalien

3.1.2.1 ELISA

Dikaliumhydrogenphosphat, MicroSelect > 99,5 %	Fluka	60353
Dinatriumhydrogenphosphat, Dihydrat, MicroSelect > 99 %	Fluka	71644
Kaliumdihydrogencitrat, p.a.	Fluka	60215
Kaliumdihydrogenphosphat, MicroSelect > 99,5 %	Fluka	60219
Natriumcarbonat, MicroSelect > 99,5 %	Fluka	71345
Natriumazid, reinst	Merck ²⁸	66.880.100
Natriumchlorid, ultra, MicroSelect > 99,5 %	Fluka	71378
Natriumdihydrogenphosphat, Dihydrat, MicroSelect > 99 %	Fluka	71502
Natriumhydrogencarbonat, MicroSelect > 99,5 %	Fluka	71627
Schwefelsäure 95-97 %, p.a.	Merck	1.007.312.511
Sorbinsäure Kaliumsalz, p.a. > 99 %	Fluka	85520
Tetrabutylammonium-borhydrid, purum, > 98 % (TBABH)	Fluka	86855
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, research grade (TMB)	Sigma [®]	T-0440
Tween [®] 20, pure	Serva ²⁹	S3740
Wasserstoffperoxid 30 %, p.a.	Fluka	95302

3.1.2.2 Standardsubstanzen

Amoxicillin trihydrat, Vetranal [®] , 97,8 %	RdH ^{®30}	46060
Chlortetracyclin hydrochlorid, Vetranal [®] , 78,1 %	RdH [®]	46133
Ciprofloxacin hydrochlorid, 99,2 %	Bayer	Testsubstanz
Clindamycin hydrochlorid, 94,0 %	Ehrens. ³¹	C11670100
Dihydrostreptomycin sesquisulfat, > 99 %	Fluka	37386
Doxycyclin hydrochlorid, > 98,0 %	Fluka	44577
Enrofloxacin, 99,7 %	Bayer	Testsubstanz
Erythromycin dihydrat, Vetranal [®] , 94,4 %	RdH [®]	46256
Oxytetracyclin, Vetranal [®] , 96,2 %	RdH [®]	46598
Penicillin G potassium salt, Vetranal [®] , 99,8%	RdH [®]	46609
Penicillin V potassium salt, Vetranal [®] , 95,7%	RdH [®]	46616
Streptomycinsulfat, 95 %	AppliC. ³²	A 1852.0025

²⁸ Merck-Chemikalien erhältlich über VWR International
²⁹ Tween[®] 20, pure erhältlich über Sigma-Aldrich oder VWR
³⁰ RdH[®] Riedel-de Haën[®]
³¹ Dr. Ehrendorfer
³² AppliChem

Sulfadiazin, Vetranal [®] , 99,9 %	RdH [®]	35033
Sulfadimidin, Vetranal [®] , 99,7 %	RdH [®]	46802
Sulfamethoxazol, Vetranal [®] , 99,9 %	RdH [®]	46850
Tetracyclin hydrochlorid, Vetranal [®] , 96,5 %	RdH [®]	46935
Trimethoprim, Vetranal [®] , 99,5 %	RdH [®]	46984
Tylosin Hemitartrat Vetranal [®] , 91,4 %	RdH [®]	46992

3.1.2.3 weitere Chemikalien (verwendet zur Synthese, Probenvorbereitung, HPLC)

4-Aminobenzoesäurehydrazid, 95 %	Aldrich [®]	A-4,190-9
Ammoniaklösung 25 %, p.a.	Merck	1.054.322.500
Ammoniumacetat, > 99 %	Merck	1.161.030.250
Bernsteinsäureanhydrid, purum, > 97 %	Fluka	14090
Carboxymethylamin Hemihydrochlorid, > 98 %	Aldrich [®]	C1,340-8
Casein (Natriumsalz)	Sigma [®]	C-8654
2,4-Dinitro-1-fluorbenzen, > 99 %	Fluka	42080
Essigsäure (Eisessig), 100 %, wasserfrei	Merck	1.595.200.100
Essigsäure, > 99,5 %, p.a.	Fluka	45730
Ethanol, wasserfrei, > 99,5 %	Merck	1.590.090.050
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dikaliumsalz Dihydrat, puriss., p.a., > 99,0 %	Fluka	3660
Ethylenglycol, > 99,8 %, Riedel-de Haën [®]	RdH [®]	34907
Glutaraldehyd 25 % Lösung in Wasser	Aldrich [®]	G400-4
Glutarsäureanhydrid zur Synthese	Merck	8.206.040.005
Glycerol, anhydrous, > 99,5 %	Fluka	49767
Hemocyanin from Keyhole Limpet (KLH)	Sigma [®]	M-5899
L-Lysin, purum, > 98 %	Fluka	62840
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, 99 %	Aldrich [®]	D-8,000-2
N,N-Dimethylformamid, puriss. > 99,8 %	Fluka	40248
Natrium(meta)periodat, ultra, > 99,5 %	Fluka	71859
Natriumacetat, wasserfrei, p.a.	Merck	4090520
Natriumborhydrid 99 %	Aldrich [®]	21,346-2
N-Hydroxysuccinimid, zur Synthese	Merck	8.045.180.025
Oxalsäure Dihydrat, p.a.	Merck	1.00495.0100
Peroxidase (POD) from horse-radish	Roche	814393
Pyridin, > 99,8 %, p.a.	Fluka	82702
Sulfamethazine (Sulfadimidin), > 99 %	Sigma [®]	S-6256
Sulfamethoxazol	Sigma [®]	S-7507

3.1.2.4 Lösungsmittel

Acetonitril	Roth®	P.7328.1
Ethanol, absolut, z.A.	Merck	1.00983.1001
Ethanol, Wasserfrei	Merck	1.59009.0050
Ethylacetat, SupraSolv®	Merck	1.10972.2500
Methanol, RotiSolv® HPLC, > 99,5 %	Roth®	P.717.1
N,N-Dimethylacetamid, puriss. über Molekularsieb > 99,5 %	Sigma®	38839
Pyridin, puriss., p.a.	Fluka	82702
Tetrahydrofuran, puriss., p.a., > 99,5 %	Fluka	87368

Reinstwasser: bestand aus deionisiertem Wasser, welches durch eine MilliQPlus 185 Anlage weiter aufgereinigt wurde

3.1.2.5 Antikörper und erhaltene (=geschenkte) Tracer

Anti-Mouse IgG (whole molecule), host: goat	Sigma®	M-5899
Streptomycin, monoclonal, IgG ₁ , Mak 4 E2	Schnappinger et al. [155]	
peroxidasemarkiertes Streptomycin, lyophilisiert	Schnappinger et al. [155]	
Sulfadimidin, polyclonal, Serum, lyophilisiert	Fránek et al. [156]	
peroxidasemarkiertes Sulfadimidin, in Glycerin	Fránek et al. [156]	

3.1.3 Puffer und Lösungen

Carbonat-Puffer (Coating-Puffer, pH 9,7 ± 0,1)

Na ₂ CO ₃	15 mmol/L	3,98 g
NaHCO ₃	25 mmol/L	7,33 g
NaN ₃	3 mmol/L	0,50 g

mit Reinstwasser auf 2500 mL auffüllen

Phosphat -Puffer (Inkubations-Puffer PBS³³, pH 7,6 ± 0,1)

NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	10 mmol/L	3,90 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	70 mmol/L	31,15 g
NaCl	145 mmol/L	21,25 g

mit Reinstwasser auf 2500 mL auffüllen

³³ PBS-Puffer

phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

Citrat-Puffer (Substrat-Puffer, pH 3,8 ± 0,1)

KH ₂ -Citrat	200 mmol/L	115,0 g
Sorbinsre.-Kaliumsalz		0,25 g

mit Reinstwasser auf 2500 mL auffüllen

Kaliumphosphat -Puffer mit Tween[®] (Wasch-Puffer Konzentrat 60fach)

KH ₂ PO ₄	43,3 mmol/L	14,73 g
K ₂ HPO ₄	375,0 mmol/L	163,30 g
NaCl	871,8 mmol/L	127,50 g
Sorbinsre.-Kaliumsalz		0,50 g
Tween [®] 20		33,00 g

mit Reinstwasser auf 2500 mL auffüllen

zur Verwendung: 30 mL Konzentrat auf 1800 mL auffüllen (60fach verdünnen), resultierend eine Phosphatkonzentration von ca. 7 mmol/L, entsprechend ~ 1/10 des PBS-Puffers

Substrat-Lösung

Komponente 1: 17,741 mg TMB + 3,796 mg TBABH + 1,8 mL DMA

Komponente 2: 38,6 µL Perhydrol in 100 mL Citratpuffer geben

zur Verwendung: 375 µL Komponente 1 in 15,5 mL Komponente 2 lösen

Carbonat-Puffer (0,13 M)

NaHCO ₃	130 mmol/L	0,109 g
--------------------	------------	---------

mit Reinstwasser auf 10 mL auffüllen

Carbonat-Puffer (0,01 M)

NaHCO ₃	10 mmol/L
--------------------	-----------

7,69 mL des Carbonat-Puffer (0,13 M) mit Reinstwasser auf 100 mL auffüllen

Stopp-Lösung (1M)

H ₂ SO ₄	2 mol/L (H ⁺ -Konz.)	2,71 mL
--------------------------------	---------------------------------	---------

in dest. Wasser geben und auf 100 mL mit dest. Wasser auffüllen

3.1.4 Stammlösungen und Verdünnungen

3.1.4.1 Antibiotikallösungen für ELISA

Standardlösungen für ELISA-Messungen wurden aus Verdünnungen wässriger Stammlösungen hergestellt. Von den vier Substanzen (Penicillin V, Streptomycin, Sulfadimidin, Sulfamethoxazol), und gegebenenfalls Weiteren zur Testung der Kreuzempfindlichkeit, wurden jeweils Stammlösungen von ca. 20 mg/L hergestellt, indem ca. 2 mg eingewogen und im Messkolben auf 100 mL mit Reinstwasser aufgefüllt wurden. Die im Test eingesetzten wässrigen Lösungen hatten Konzentration zwischen 0,001 µg/L und 1000 µg/L. Der höchste Standard wurde direkt aus der Stammlösung hergestellt und die weiteren Standards durch sechs Verdünnungsschritte des Faktors 10 mit Reinstwasser erhalten, um eine logarithmische Skala äquidistant einzuteilen. Für die Streptomycinverdünnungsreihe wurden die Standards in PBS-Puffer angesetzt.

Die Standards wurden in 10 mL Braunglasflaschen mit Teflonseptum angesetzt und bei + 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Sulfonamidlösungen waren über mehrere Wochen bis Monate stabil und wurden nach Erschöpfung des Vorrats neu angesetzt, Penicillin V- und Streptomycin-Lösungen wurden wegen ihrer Instabilität höchstens zwei Tage lang verwendet. Vor der Messung wurden die Lösungen auf Raumtemperatur gebracht.

3.1.4.2 Antibiotikallösungen für HPLC

Es wurden sowohl einzelne Stammlösungen in Methanol (die hier verwendeten Antibiotika sind in Methanol gut löslich) angesetzt, die Konzentrationen von ca. 100 mg/L hatten (5 mg Substanz in 50 mL Messkolben), als auch Mischstandards durch Einwaage verschiedener Antibiotika in den selben Kolben. Daraus wurden weitere Verdünnungen in Methanol bis 1 mg/L (bei Sulfonamiden bis 0,05 mg/L als niedrigste Konzentrationsstufe) hergestellt. Penicilline sind in Methanol sehr instabil und wurden daher in Wasser angesetzt [123].

3.1.5 Proben

3.1.5.1 Gülleproben

Es wurden zehn Gülleproben von vier verschiedenen Betrieben aus unterschiedlichen Gebieten Nordrhein-Westfalens gezogen.

Tabelle 8: *Zeitpunkt der Gülleprobenahme, Herkunft und Art der Gülleproben*

Kennung	Gülleart	Datum	Ort, Region	Betriebsart
Betrieb 1	Schweinegülle	Jan. 2002	Erkeln, Krs. Höxter	Sauenzucht
Betrieb 2	Rindergülle	Mai 2002	Kreis Kleve	Rinderzucht
Betrieb 3	Rindergülle	Mai 2002	Rhein-Sieg-Kreis	Versuchsgut Frankenforst:
	Schweinegülle (vergoren)	Mai 2002		Schweinezucht + Rinderzucht
	Rindergülle	Jan. 2003		
	Schweinegülle, frisch	Jan. 2003		
	Schweinegülle, alt	Jan. 2003		
	Mischgülle (v.a.Rind + Schwein + Jauche)	Jan. 2003		
	Jauchewasser (Ablaufwasser aus Misthaufen)	Jan. 2003		
Betrieb 4	Rindergülle	Jan. 2003	Erfdkreis	Milchviehhaltung

- In Betrieb 1 wurden die Tiere im Bedarfsfall (z.B. bei Einstellung, Absetzen vom Muttertier, Infektionen) mit verschiedenen Medikamenten behandelt, die auch Antibiotika enthalten. Dies waren:

Vetoprim[®] 24 % (enthält Trimethoprim, Sulfadimidin, Sulfathiazol)

Orospray[®] von Vetoquinol (enthält Chlortetracyclin, Sulfanilamid)

Tylan 200[®] (enthält Tylosin-Base)

Baytril® 10 % (enthält Enrofloxacin)

Prostad 1 (Futtermittel, enthält Colistin, Amoxicillin)

Tardomyocel® (enthält Benzylpenicillin-Benzathin 100.000 I.E., Benzylpenicillin-Procaïn 25.000 I.E., Dihydrostreptomycinsulfat)

- In Betrieb 3 waren nur Angaben über die Verwendung von Medikamenten aus dem Sauenbereich und dem Mastschweinebereich zu erhalten, nicht aus dem der Rinderzucht. Im Mastschweinebereich wurden im Bedarfsfall folgende Medikamente eingesetzt:

Baytril® (enthält Enrofloxacin)

Medipen® (enthält Benzylpenicillin)

Im Sauenbereich (mit Ferkeln) wurden zusätzlich Medikamente mit den Wirkstoffen Amoxicillin (Präparat Duphamox®), Ampicillin, Tetracyclin und Florfenicol verwendet.

- Über die Anwendung von Medikamenten in den Betrieben 2 und 4 ist nichts bekannt.

3.1.5.2 Bodenproben

Die Bodenproben wurden von den gleichen Betrieben gezogen, von denen die Gülleproben stammten. Die bewirtschafteten Flächen, die beprobt wurden, waren zuvor mit Gülle aus dem jeweiligen Betrieb gedüngt worden. Die ausgebachte Gülle war zwar nicht identisch mit der untersuchten Gülle aus Kap. 3.1.5.1, da die Applikation auf die Böden zu einem anderen Zeitpunkt geschah, als die Gülleprobenahme, sie war aber gleichen Typs und enthielt daher wahrscheinlich gleichartige Rückstände.

Tabelle 9: *Zeitpunkt der Bodenprobenahme, sowie Beschreibung der vorher erfolgten Behandlung der Böden*

Betrieb	ausgebrachte Gülle	Datum	letzte Ausbringung	Anbau
B 1	Schweinegülle	Jan. 2002	Mai 2001, 8 Monate vor Probenahme	Gerste, Fabaceae, Winterweizen (in Jan. 2002)
B 3	Schweinegülle	Jan. 2003	Oktober 2002, auch zuvor stets Schweinegülle	vor Ausbringung Mais, dann Winterweizen (in Jan. 2003)
B 3	Rindergülle	Jan. 2003	Oktober 2002, insgesamt 3 x in 2002, stets mit Rindergülle	kein Anbau, mit Gras bewachsen
B 4	Rindergülle	Jan. 2003	März/April 2002, 9 Monate vor Probenahme	Rüben, Weizen

3.1.5.3 Abwasserproben

Es wurden Abwasserproben von zwei verschiedenen Kläranlagen untersucht:

Kläranlage 1 - Troisdorf

Die konventionelle Kläranlage in Troisdorf ist für 70.000 Einwohnergleichwerte ausgelegt. An Reinigungsverfahren verfügt sie über eine mechanische Vorreinigung, sowie über eine biologische Klärstufe, bestehend aus aeroben Belebungsbecken zur Nitrifikation, sowie aus anoxischen Absetzbecken zur Denitrifikation. Aufgrund der Größe der Anlage existieren die biologischen Stufen in fünf parallelen Straßen.

Im März 2004 wurde eine Probe des Zulaufs entnommen.

Kläranlage 2 - Troisdorf-Altenrath

Die Kläranlage in Altenrath ist eine Pflanzenkläranlage, an die ca. 150 Einwohner angeschlossen sind. Das Verfahren der Abwasserbehandlung in solchen Anlagen unterscheidet sich stark von dem in konventionellen Anlagen. Statt den üblichen verschiedenen Klärstufen, durchfließt das Abwasser hier lediglich verschiedene

Absetzbecken, um eine Abtrennung des Feststoffanteils zu gewährleisten. Anschließend wird die Wasserphase auf ein Schilffeld verrieselt, in welchem durch Adsorption, Filtration und mikrobiellen Abbau eine Reinigung des Abwassers geschieht. Nach einer gewissen Zeit, die das Wasser benötigt um die verschiedenen Bodenschichten zu passieren, wird das Perkolat abgepumpt und einem kleinen Bach als Vorfluter zugeführt. Ein Teil des geklärten Abwassers wird, zur Verdünnung des Zulaufwassers, diesem wieder zugeführt und gelangt so nochmals auf das Rieselfeld.

Es wurde eine Zulaufprobe, eine Ablaufprobe innerhalb der Anlage, sowie eine Ablaufprobe an der Ablaufstelle zum Vorfluter im August 2003 entnommen und untersucht.

3.1.5.4 Oberflächenwasserproben

Zwischen November 2001 und Januar 2004 wurden insgesamt mehr als 170 Oberflächenwasserproben entnommen und untersucht. Gewässer der Region Köln-Bonn (16 verschiedene, ohne Rotterbach und Rotter See) wurden erstmalig im November 2001, dann im April 2002 beprobt und zur Zeitreihenuntersuchung zwischen Dezember 2002 und Januar 2004 an acht Terminen im Abstand von zwei Monaten untersucht. Die Proben wurden stets an den gleichen Bach- oder Flussabschnitten gezogen.

Bei den Gewässern der Regionen Hochsauerland, Niederrhein und Ostwestfalen handelte es sich um Proben, die ein einziges Mal im gesamten Zeitraum entnommen und untersucht worden sind: Hochsauerland (April 2003), Ostwestfalen (Januar 2002), Niederrhein (Januar 2003, Niers Dezember 2001). Auch bei Rotterbach (Dez. 2001) und Rotter See (September und November 2003, Januar 2004) handelte es sich nur um Einzeluntersuchungen.

Die genauen Orte und Stellen der Probenahme sind für jedes einzelne Gewässer aus der Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: *Orte der Probenahme der Oberflächenwasserproben*

Gewässer	Ort	Probenahmestelle
Region Köln-Bonn		
Agger	Troisdorf	kurz vor Einmündung in Sieg
Ahrenbach	Oberauel	direkt vor Einmündung in Sieg
Bröl	Winterscheiderbröl	hinter Mündung Dreisbach
Bruchbach	Köln-Holweide	
Dhünn	Leverkusen-Schlebusch	unterhalb Mündung Leimbach
Ertf	Liblar	zw. Lechenich u. Liblar
Jungbach	Miel	vor Einmündung in Eulenbach
Neffelbach	Eggersheim, Gem.Nörvenich	oberhalb Eschweiler Fließ
Rhein	Köln-Westhofen	km 681
Rotbach	Ertfstadt-Ahrem	oberhalb Einm. Mühlenbach
Rotterbach	Rheinbach-Peppenhoven	
Rotter See	Troisdorf-Sieglar	
Sieg	Oberauel	hinter Mündung Ahrenbach
Sieglarer Mühlgraben	Troisdorf-Mülleken	
Strunder Bach	Köln-Holweide	
Swistbach	Weilerswist	AS Weilerswist der BAB 61*
Vilicher Bach	Schwarzrheindorf	hinter Kläranlage Bonn-Beuel
Wupper	Leverkusen-Rheindorf	kurz vor Mündung in Rhein
Ostwestfalen		
Boker-Heide-Kanal	Paderborn-Sande	
Emmer	Glashütte	hinter dem Emmer-Stausee
Nethe	Amelunxen (Kreis Höxter)	
Pader	Paderborn	
Weser	Höxter	
Wörmkebach	Lügde	vor Eintritt in die Emmer
Niederrhein		
Issel	Wesel-Obrighoven	unter BAB 3*
Niers	Wachtendonk	
Wesel-Datteln-Kanal	Krudenburg (Hünxe)	unter BAB 3*
Hochsauerland		
Elpe	Ostwig	vor Einmündung in die Ruhr
Neger	Wulmeringhsn. b. Olsberg	vor Einmündung in die Ruhr
Ruhr	Wehrstapel	
Valme	Bestwig	

* BAB = Bundesautobahn

3.2 Methoden

3.2.1 Probenahme

Bodenproben

Zur Beprobung landwirtschaftlich genutzter Flächen wurden mit einem Pflanzeisen im Abstand mehrerer Meter zueinander, auf einer Fläche von ca. 15 m², 3-4 Bodenstücke von ca. 8 cm Durchmesser und einer Tiefe von 0-15 cm ausgestanzt, in Gefrierbeutel oder Glasgefäße gefüllt und entweder gefroren oder bei + 4 °C gelagert. Im Labor wurden diese Unterproben, jeweils etwa 500-800 g, zu einer Probe vereinigt und homogenisiert, indem eine Vermischung im Mörser geschah.

Gülleproben

Güleetanks und -behälter wurden mit Hilfe einer großen Schöpfkelle gerührt und ca. 2 L aus einem Bereich von 50 cm unter der Oberfläche entnommen und in Weckgläser gefüllt. Alternativ erfolgte eine Probenahme in 2,5 L Braunglasflaschen, nach Durchmischen des Güleetanks und des zugehörigen Leitungssystems durch eine installierte Pumpe, am Auslassventil. Die Proben wurden am selben Tag ins Labor transportiert, bzw. sofern dies nicht möglich war, sofort gekühlt und schnellstmöglich zum Labor gebracht. Bis zur Messung wurden sie bei + 4 °C gelagert.

Wasserproben

Zur Entnahme der Oberflächenwasserproben wurden 2,5 L Braunglasflaschen mit Teflonseptum verwendet. Die Probenahme erfolgte möglichst in der Mitte des Gewässers. Dazu wurde es bis zu einer Wassertiefe von 30 cm betreten und die Flasche nach mehrmaligem Ausspülen mit Wasser aus einer Tiefe von 30 cm befüllt (bei flacheren Gewässern am Grund). Um der Mitte des Gewässers so nah wie möglich zu kommen, wurde ggfls. die Probe am Ende hineinragender Felsaufschüttungen entnommen, oder die Flasche von Brücken herabgelassen. Zulaufproben von Kläranlagenwässern wurden vom Überstand des Absetzbeckens, Ablaufproben am Ablauf in die Vorfluter entnommen. Die Proben wurden bis zur Aufbereitung (in der Regel nach 2-3 Tagen) bei + 4 °C gelagert.

3.2.2 HPLC-UV Verfahren

Die HPLC-UV Verfahren wurden angewandt, um nach entsprechender Aufreinigung oder Anreicherung Boden- und Gülleproben zu messen.

Tabelle 11: *HPLC- und UV-Bedingungen zur Trennung und Detektion von Sulfonamiden, Penicillinen, Tetracyclinen und Fluorochinolonen*

	Sulfonamide	β-Lactamantibiotika	Tetracycline + Fluorochinolone
	Sulfadimidin Sulfadiazin Sulfamethoxazol	Benzylpenicillin Phenoxymethylpenicill. Amoxicillin	Chlortetracyclin Doxycyclin Oxytetracyclin Tetracyclin Ciprofloxacin Enrofloxacin
HPLC-Säule	Spherisorb ODS II, 5,0 µm, 250 x 4,6 mm	Spherisorb ODS II, 5,0 µm, 250 x 4,6 mm	C 18 Micro 2 MZ-PBM 3,0 µm, 250 x 2,1 mm
Vorsäule	Typ wie Trennsäule, Maße 30 x 4,6 mm	Typ wie Trennsäule, Maße 30 x 4,6 mm	Typ wie Trennsäule, Maße 30 x 2,1 mm
Hersteller	Bischoff Chromato- graphie, Leonberg	Bischoff Chromato- graphie, Leonberg	MZ Analysentechnik, Mainz
Temperatur	35 °C	35 °C	50 °C
Elutionsmittel	Ammoniumacetat- Puffer (pH 4,6) : Acetonitril (75 : 25)	Acetonitril : Essigsäure : Wasser (40 : 1 : 59)	Methanol : Acetonitril : Oxalsäure-Puffer (0,003 M) (23 : 48 : 29)
Elutionsart	isokratisch	isokratisch	isokratisch
Flussrate	1,0 mL/min	1,0 mL/min	0,3 mL/min
Wellenlänge	265 nm / 240 nm	230 nm	360 nm / 278 nm
sonstiges	Trennung innerhalb von 8 min	Trennung innerhalb von 17 min	Trennung innerhalb von 45 min, ab Minute 26 ? = 278 nm zur Detek- tion von CFL und EFL

Bei den Tetracyclinen und Fluorochinolonen war genau auf die Einhaltung der Zusammensetzung des Eluenten zu achten, da ansonsten eine Trennung nicht mehr möglich war. Beim Ansetzen des Elutionsgemisches musste zunächst Oxalsäure vorgelegt werden, dann Methanol hinzugegeben und anschließend Acetonitril hineingegeben werden, da durch Volumenkontraktion sich bei anderer Reihenfolge andere Verhältnisse ergeben konnten.

Zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden Standards mit Konzentrationen von 0,5-10 mg/L gemessen (Sulfonamide 0,025-1 mg/L) und die Höhe des Signals mit der Höhe des Rauschens verglichen und abgeschätzt, bei welcher Konzentration die Signalthöhe das dreifache bzw. das zehnfache des Rauschens beträgt.

3.2.3 SPE-Materialauswahl und Anreicherungsbedingungen

Um Proben wie Boden, Gülle oder Abwasser per HPLC-UV zu messen, müssen Extrakte hergestellt werden, die den Analyten möglichst vollständig enthalten, die aber einen deutlich reduzierten Matrixanteil aufweisen. Besonders in Gülle ist aufgrund der komplexen Matrix ein weiterer Schritt des Clean-ups notwendig, auch wenn aufgrund der Analytkonzentrationen die Proben schon im messbaren Bereich liegen

Des Weiteren kann es mitunter erforderlich sein, Steigerungen der Gehalte zu erzielen, um Proben niedriger Konzentrationen in den messbaren Bereich einzustellen. Ein solcher Aufkonzentrierungsschritt ist weniger bei Gülle erforderlich, da die Analyt-Konzentrationen in den Proben oft schon im messbaren Bereich liegen. Vielmehr notwendig ist er aber bei Bodenproben, da darin Konzentrationen im $\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich zu erwarten sind, wie in Kapitel 2.8.2 abgeschätzt wurde. Vor allem ist dies aber bei Oberflächenwasserproben erforderlich, da die zu vermutenden Konzentrationen nur im ng/L - bis im unteren $\mu\text{g}/\text{L}$ -Bereich liegen. Neben einer starken Anreicherung (Faktor 1000) müssen hier auch besonders nachweisstarke Messmethoden (LC-MS/MS) angewandt werden, da eine Messung per HPLC-UV zu unempfindlich ist.

Neben der Abtrennung von Matrix und der Anreicherung kann eine weitere Voraussetzung zur Messung darin bestehen, dass Proben, die im Normalfall ein wässriges Milieu haben, vor der Messung erst in einer organischen Phase vorliegen müssen.

Variationsmöglichkeiten

Es sollte ein Verfahren entwickelt werden, durch das Substanzen aus verschiedenen Antibiotikaklassen gemeinsam angereichert werden können. Das Problem dabei ist, dass die physikochemischen Eigenschaften der Stoffe sehr unterschiedlich sind, d.h. dass sie starke Polaritätsunterschiede aufweisen und somit die Adsorption an Materialien sehr verschieden sein kann. Neben der Variation der Art und der Menge des Säulenmaterials, bestehen Optimierungen in der SPE-Methode auch in der Wahl des Elutionsmittels (auch des Elutionsvolumens), der Verwendung eines Waschschruttes, des Lösungsmittels, in denen eingetrocknete Eluate aufgenommen werden und des pH-Wertes, auf den die Proben eingestellt werden, oder auch in der Wahl der Zugabe von weiteren Mitteln, wie z.B. Komplexbildnern.

Arbeitsschritte zur Festphasenanreicherung:

1. Konditionierung der SPE-Phase
2. Einstellen der Probe
3. Saugen/Drücken der Probe durch die Säule
4. Waschen und Trocknen der SPE-Säulen
5. Elution der Substanzen
6. Einengen des Eluates
7. Aufnahme in Lösungsmittel zur Messung

3.2.3.1 Materialauswahl

Es wurden zunächst verschiedene Säulenmaterialien getestet, wobei sowohl herkömmliche unpolare Octadecylphasen (C18), als auch modernere Polymerphasen³⁴ miteinander verglichen wurden. Dazu wurden Anreicherungen von Sulfonamiden, Penicillinen, Fluorochinolonen und Tetracyclinen³⁵ aus wässrigen Proben unter exakt den gleichen Bedingungen durchgeführt, einerseits mit BakerBond C18 Polar Plus von J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA und SepPak RP18 von Waters, Eschborn, und andererseits mit den Polymermaterialien LiChrolut EN, Merck, Darmstadt und IsoluteTM ENV+ von Separtis, Grenzach Whylen.

³⁴ Polymerphasen Sie besitzen sowohl polare als auch unpolare Gruppen, und können daher auch polarere Stoffe, wie Pharmaka anreichern. Dabei haben pp-Wechselwirkungen eine große Rolle bei der Adsorption.

³⁵ Antibiotika Sulfadiazin, Sulfadimidin, Sulfamethoxazol, Chlortetracyclin, Doxycyclin, Oxytetracyclin, Tetracyclin, Penicillin V, Penicillin G, Ciprofloxacin, Enrofloxacin

Es wurde außerdem die Anwendbarkeit des Kationenaustauschermaterials Dowex getestet, wozu dotiertes Wasser vor Aufgabe auf die gequellten Säulen auf pH 2 angesäuert wurde.

Des Weiteren wurden verschiedene Polymerphasen verglichen, um besonders die Bestimmung von Antibiotika im ng/L-Bereich in Oberflächenwasserproben per LC-MS/MS zu optimieren. Dabei wurden zur Anreicherung von Sulfonamiden, Penicillinen, Tetracyclinen und Fluorochinolonen fünf Polymerphasen im Vergleich getestet: LiChrolut EN (Merck, Darmstadt), Chromabond EASY (Macherey-Nagel, Düren), Strata SDBL, Strata X³⁶ (beide Phenomenex, Aschaffenburg) und ENVI-Chrom P (Supelco/Sigma-Aldrich, München).

Da manche Materialien nach Herstellerangabe sogar ohne Konditionierung bei gleich bleibender Kapazität und Selektivität und ohne Konsequenzen für die Anreicherung verwendet werden könnten, wurde der Vergleich konditioniert zu nicht-konditioniert durchgeführt.

3.2.3.2 Vorbereitung der Proben

Alternativ wurde dotiertes Wasser³⁷ vor der Anreicherung entweder neutral belassen, oder auf pH 3 mit konz. Essigsäure angesäuert (mit LiChrolut EN als SPE-Material). Es wurde getestet, ob es Unterschiede in der Festphasenextraktion bzw. in der Messung der Extrakte gibt, wenn die Proben mit konz. Essigsäure oder mit 50 %iger Schwefelsäure auf pH 3 angesäuert werden. Die Ansäuerung wurde insofern weiter variiert, indem eine leichte Ansäuerung (1 mL konz. Essigsäure auf 800 mL Wasserprobe) mit einer etwas stärkeren Ansäuerung (2-3 mL konz. Essigsäure auf 800 mL Wasserprobe) verglichen wurde. Als SPE-Material diente hierbei Strata X.

Der Einfluss einer Komplexierung auf die Festphasenextraktion mit Strata X und die Anreicherung der Substanzen wurde getestet, indem

³⁶ Strata X Styrol-Divinylbenzol-Kopolymer

³⁷ dotiertes Wasser Bei den Optimierungsexperimenten wurde normales Laborleitungswasser oder ein Oberflächenwasser, dotiert mit Standardlösungen (von Sulfonamiden, Tetracyclinen, Penicillinen, Fluorochinolonen, mitunter auch von Clindamycin, Erythromycin, Trimethoprim und Tylosin), verwendet.
Penicilline konnten in keinem der Extrakte gefunden werden. Daher wurde in den Experimenten, in denen es um die Anreicherung von Penicillinen ging, demineralisiertes Wasser dotiert, wodurch auch die Penicilline gefunden werden, da hierin keine Stoffe oder Bedingungen vorliegen, durch die die Penicilline abgebaut oder nicht angereichert werden.

1. eine geringe Menge (0,5 mg in 100 mL Wasserprobe) des Komplexbildners Na₂EDTA zu den Proben, oder
2. 200 mg K₂EDTA in 800 mL Probe gegeben wurde.

3.2.3.3 Lösungsmittelauswahl

Als Lösungsmittel zur Elution der an der Festphase LiChrolut EN adsorbierten Substanzen (wieder Sulfonamide, Penicilline, Tetracycline und Fluorochinolone, wie in Fußnote 35) wurden reines Methanol (4 mL), Acetonitril (4mL) und Ethylacetat (4 mL), sowie die Kombinationen Methanol + Acetonitril (2 + 2 mL) und Methanol + Ethylacetat (2 + 2 mL) verglichen.

Zur Aufnahme der eingengten Eluate vor der HPLC-UV oder der LC-MS/MS Messung wurden verschiedene Lösungsmittel verglichen: Es wurden die gleichen Antibiotika wie oben beschrieben aus wässriger Lösung mit LiChrolut EN angereichert, nach Trocknung mit Methanol eluiert, nach Einengung der Eluate mit Methanol, Ammoniumacetatpuffer oder einem Gemisch aus Wasser : Acetonitril (90 : 10) aufgenommen und per HPLC-UV gemessen.

3.2.4 Methoden zur Bestimmung von Antibiotika in Wasserproben

3.2.4.1 Anreicherung von Wasserproben

Zur Anreicherung von Wasserproben wurden zwei verschiedene Methoden verwendet.

Methode 1

Hierbei handelt es sich um eine Methode von Färber und Skutlarek [121, 157, 158], die auf der SPE-Anreicherung mit den zwei Materialien OASIS HLB (Waters, Eschborn) und SDB-2 (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) basiert. Die Anreicherung und Messung von Proben, die mit dieser Methode untersucht wurden, geschah durch Skutlarek et al. am Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit in Bonn. Die Proben wurden zuvor durch EDTA komplexiert. Die Elution von den Säulen geschah mit Methanol, sowie Methanol + 1 % (v/v) Ameisensäure.

Mit einer Anzahl von 29 Stoffen deckt die Methode einen Großteil der auf dem Markt befindlichen Substanzen ab. Sie enthält Penicilline, Aminopenicilline, Makrolide, Lincosamide, Glycopeptide, Sulfonamide, Fluorochinolone und Tetracycline (siehe Tab. 12).

Table 12: *Substanzen, die in der Methode von Färber et al. erfasst werden*

β-Lactam-Antibiotika	Makrolide u. Verwandte	Sulfonamide u. Synergist	Fluorochinolone	Tetracycline
Amoxicillin	Azithromycin	Sulfadimidin	Ciprofloxacin	Chlortetracyclin
Ampicillin	Clarithromycin	Sulfamethoxazol	Ofloxacin	Doxycyclin
Benzylpenicillin	Clindamycin	Trimethoprim		Oxytetracyclin
Cloxacillin	Erythromycin			Tetracyclin
Dicloxacillin	Roxythromycin			
Flucloxacillin	Spiramycin			
Methicillin	Tylosin			
Mezlocillin	Vancomycin			
Nafcillin				
Oxacillin				
Piperacillin				
Phenoxymethylpenicillin				

Methode 2

Diese Methode wurde entwickelt und abgeleitet aus den Ergebnissen der Experimente zu „SPE-Materialauswahl und Anreicherungsbedingungen“ (siehe Kapitel 3.2.3 und 4.1.2).

Table 13: Arbeitsschritte zur Anreicherung von Oberflächenwasserproben

Schritt	Durchführung	Material
1. Filtration	Etwa 900 mL der Wasserprobe werden durch einen 0,45 µm Membranfilter mit aufliegendem Glasfaserfilter filtriert	Membranfilter ME 25, Glasfaserfilter GF 8, Ø 10 cm
2. Abmessen	Abwiegen einer Menge von 800,0 g der Wasserprobe in Weck-Gläser	Waage, Genauigkeit von ± 0,1 g
3. Komplexierung	Zugabe von 1 mL einer K ₂ EDTA-Lösung (200 mg/mL), entsprechend 200 mg	
4. Ansäuerung	Zugabe von 2 mL konz. Essigsäure (~ pH 3)	
5. Säulenvorbereitung	Waschen mit 2 x 2 mL Methanol Konditionierung mit 3 x 2 mL Reinstwasser	200 mg Strata X in 8 mL PP-Säulen
6. Aufgabe	Saugen durch die Säule mit < 5 mL/min	
7. Waschen	Ausspülen der Gläser mit 10 ml + 5 mL Reinstwasser, und jeweils Aufgabe auf die Säulen	
8. Trocknen	Trocknen der Säulen im Stickstoffstrom, bis das Material pulvrig-locker ist, Dauer ca. 1 h	Schlauchsystem mit N ₂ -Anschluss
9. Elution	Elution mit 2 x 2 + 1 x 1 mL Methanol in Reagenzgläser	
10. Eindampfen	Einengen der Eluate mit Stickstoff im Wasserbad bei 30 °C; wenn Rest ca. 1 mL, Abspülen der RG-Innenwand mit 1 mL MeOH und vollständiges Eintrocknen	SLS 02 Evaporator
11. Aufnahme	Aufnahme in 0,8 mL Wasser : Acetonitril (9:1) unter Ultraschallbehandlung	Ultraschallbad
12. Mikrofiltration	Aufziehen des aufgenommenen Eluates und Drücken durch 0,2 µm Spritzenfilter in Braunglasvial mit Teflonseptum	1 mL Luerspritze, 0,2 µm Gelman Acrodisc Filter
13. Aufbewahrung	Bis zur Messung werden die Extrakte bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt	Schraubgewinde-Probeflaschen, dunkel, TFE/Silikon Septum

Mit der Methode 2 können neun verschiedene Antibiotika aus Wasserproben 1000fach angereichert werden: Ciprofloxacin, Clindamycin, Enrofloxacin, Erythromycin, Phenoxy-methylpenicillin, Sulfadimidin, Sulfamethoxazol, Trimethoprim, Tylosin.

3.2.4.2 HPLC-MS/MS Verfahren

Die Messungen der Extrakte (beider Anreicherungsverfahren) der Oberflächenwasserproben und der Abwasserproben erfolgten nach flüssigchromatographischer Trennung massenspektrometrisch nach einer Methode von Färber und Skutlarek [121, 157, 158]. Die Bestimmungen wurden am Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit in Bonn durch Skutlarek et al. durchgeführt.

HPLC: 1100er Serie von Agilent Technologies
 MS: API 2000 Tandem-MS von Applied Biosystems
 Steuersoftware: ANALYST 1.1 von Applied Biosystems

Die Trennung erfolgt an einer SYNERGITM Hydro-RP C 18 Säule, 4,0 µm, 150 x 2,0 mm von Phenomenex, wobei die Elution mit 100 % des wässrigen Eluenten beginnt (siehe Tab. 14).

Tabelle 14: *Elutions- und HPLC-Bedingungen*

Eluent	A: 0,1 % Ameisensäure in Wasser B: Acetonitril (0,1 % Ameisensäure)		
Gradient	0 min	100 % A	0 % B
	2 min	100 % A	0 % B
	30 min	5 % A	95 % B
	35 min	5 % A	95 % B
	36 min	100 % A	0 % B
	60 min	100 % A	0 % B
	Flussrate	0,2 mL/min	
Säulentemperatur	30 °C		
Injektionsvolumen	10 µL		

Anschließend erfolgt die Ionisation durch Elektronenspray im Positiv-Ionen Modus (ESI⁺). Die Identifikation geschieht über die protonierten Molekülonen (M+H⁺) und anhand von protonierten Tochterionen, die im multiple reaction mode (MRM) erhalten werden. Die Substanz Erythromycin wird als Dehydrato-Erythromycin detektiert (M-H₂O+H)⁺.

Tabelle 15: *Geräteparameter der MS/MS-Bestimmung nach Angaben der Steuer-
software, - Teil 1*

Massenspektrometer - Einstellungen

Period	1		
Duration	20 min		
Cycle Time	1,050 secs		
# Cycles	1143		
Period Delay	10 min		
Period	1	Experiment	1
Scan Mode	None		
Scan Type	Positiv MRM	Curtain Gas	25 Psi
Resolution Q 1	UNIT	Ion Spray Voltage	5500 V
Resolution Q 2	UNIT	Temperature	375 °C
Intensity Thres.	0,00 cps	Ion Source Gas 1	40 Psi
Smart Settling	Off	Ion Source Gas 2	80 Psi
Settling Time	0,00 ms	Interface Heater	On
MR Pause	5,00 ms	Collision Gas	2
MCA	No	Step Size	0,00 amu

Valco Ventil - Einstellungen

Time 0,0 min	Position B (Abfall)
Time 20,0 min	Position A (Spektrometer)
Time 40,0 min	Position B (Abfall)

Tabelle 16: Geräteparameter der MS/MS-Bestimmung - Teil 2

Substanz	Time [ms]	Declustering Pot. DP [V]	Focussing Potential FP [V]	Entrance Potential EP [V]	Collision Cell Entr. Potential CEP [V]	Collision Energy CE [V]	Collision Cell Exit Potential CXP [V]
Amoxicillin	30	10	380	-10	18	30	4,0
Ampicillin	30	36	380	- 9	16	25	0,5
Benzylpenicillin	30	36	380	-10	16	20	2,5
Cloxacillin	30	60	200	-10	22	21	2,5
Dicloxacillin	30	55	380	-10	23	21	1,5
Flucloxacillin	30	60	380	-10	24	23	2,0
Methicillin	30	16	380	-10	18	27	2,0
Mezlocillin	30	70	380	-10	26	31	5,5
Oxacillin	30	46	380	-10	20	21	2,5
Nafcillin	30	55	380	-10	18	17	2,0
Phenoxymethylpen.	30	65	380	-10	26	33	2,0
Piperacillin	30	55	380	-10	17	15	2,0
Trimethoprim	30	60	380	-10	16	35	4,5
Sulfadimidin	30	26	380	-10	14	25	2,5
Sulfamethoxazol	30	33	380	-10	14	23	1,5
Azithromycin	30	14	380	-10	20	37	2,0
Clarithromycin	30	60	380	-10	36	41	1,5
Clindamycin	30	55	380	-10	20	39	0,5
Erythromycin*	30	54	380	-10	34	42	1,5
Roxythromycin	30	46	380	-10	36	49	1,0
Spiramycin	30	14	380	-10	20	29	2,0
Tylosin	30	110	380	-10	45	53	1,5
Vancomycin	30	45	380	-10	34	24	2,0
Ciprofloxacin	30	55	380	-10	16	27	5,0
Oflaxacin	30	55	380	-10	17	29	6,0
Chlortetracyclin	30	18	380	-10	23	29	9,0
Doxycyclin	30	20	380	- 9	20	29	9,0
Oxytetracyclin	30	16	380	- 9	22	29	8,5
Tetracyclin	30	15	380	- 9	22	30	8,5

* Dehydrato-Erythromycin

Tabelle 17: Molekülmassen der MS-MS Detektion

Substanz	Vorläuferion, Molekülion	Tochterion	Substanz	Vorläuferion, Molekülion	Tochterion
Amoxicillin	365,9	114,1	Azithromycin	375,3	83,2
Ampicillin	349,9	106,0	Clarithromycin	748,4	158,2
Benzylpenicillin	334,9	159,9	Clindamycin	425,0	126,3
Cloxacillin	436,0	160,0	Erythromycin*	716,4	158,2
Dicloxacillin	469,9	159,9	Roxythromycin	837,2	158,1
Flucloxacillin	453,9	159,9	Spiramycin	837,2	158,1
Methicillin	381,0	165,1	Tylosin	422,4	174,2
Mezlocillin	415,0	198,9	Vancomycin	725,4	143,9
Oxacillin	402,0	159,9	Ciprofloxacin	332,0	288,1
Nafcillin	415,0	198,9	Enrofloxacin	361,0	317,1
PCV	350,9	160,1	Oflaxacin	362,0	318,1
Piperacillin	518,1	143,1	Chlortetracyclin	479,0	443,9
Trimethoprim	291,0	230,2	Doxycyclin	445,0	428,0
Sulfadimidin	279,0	186,1	Oxytetracyclin	461,0	426,0
Sulfamethoxazol	253,9	156,0	Tetracyclin	445,0	410,2

* Dehydrato-Erythromycin

Extrakte von Oberflächenwasserproben, die mit der Anreicherungs-methode 1 hergestellt worden waren, wurden auf 29 Substanzen untersucht (siehe Tab. 12). Mit Anreicherungs-methode 2 hergestellte Extrakte wurden auf die beschriebenen neun Antibiotika untersucht (siehe Kap 3.2.4.1).

Die Quantifizierung wurde über externe Kalibration vorgenommen. Dazu wurden die signalintensivsten Massen (meist das protonierte Molekülion) herangezogen. Die Standards wurden auf den Konzentrationsstufen 10, 50 und 100 µg/L in Wasser : Acetonitril (90:10) angesetzt. Als Stammlösung wurde eine 10 ppm Lösung aller 29 bzw. 9 Substanzen in Acetonitril verwendet, die bei -18 °C mehrere Monate stabil ist, und aus der die Standardlösungen immer frisch verdünnt wurden.

3.2.4.3 Methodvalidierung

a) Matrixeinfluss

Zur Ermittlung eines Einflusses der Matrix auf die Detektion und der Anwendbarkeit des externen Kalibrationsverfahrens wurden mit der beschriebenen Anreicherungs- und Extraktionsmethode Nr. 2 Extrakte von Gewässern hergestellt und vermessen. Anschließend wurden die Extrakte vereinigt, in denen keines der neun Antibiotika gemessen werden konnte. Sie repräsentierten daher Proben mit geringer oder keiner anthropogenen Beeinflussung.

Zum Vergleich wurde ein ebenso vorbereiteter Misch-Extrakt der Wupper herangezogen, die relativ stark belastet ist, und die einen mittleren kommunalen Abwasseranteil von ca. 20 % aufweist [159]. Diese zwei Proben-Extrakte wurden mit Antibiotikastammzelllösung dotiert. Die unbelastete Misch-Probe wurde auf die Stufen 0, 10, 30 und 50 ppb dotiert, der Wupperextrakt auf 0, 30 und 50 ppb. Anschließend wurden diese Proben vermessen, um den Einfluss der Matrix auf die Detektion zu erkennen.

b) Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

DIN 32645

Zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des Verfahrens wurde Leitungswasser im unteren und im sub ng/L-Bereich dotiert. Dazu wurde das Wasser mit einem Mischstandard, der von allen Antibiotika 10 µg/L enthält, so versetzt, dass jeweils 800 mL des Laborleitungswassers auf die Konzentrationen 0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 1,50, 2,00, 4,00, 6,00, 8,00 und 10,00 ng/L eingestellt waren. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie im Bereich der vermuteten Nachweisgrenze lagen. Als Matrix wurde Laborleitungswasser verwendet, da gewährleistet sein sollte, dass ein analytfreies Wasser vorliegt.

Die Proben wurden mit der Methode 2 in Kapitel 3.2.4.1 tausendfach angereicht und die Extrakte mittels des beschriebenen LC-MS/MS Verfahrens (Kap. 3.2.4.2) gemessen. Die Quantifizierung erfolgte durch externe Kalibration, die anhand von Standards in den Konzentrationen 2, 6 und 10 µg/L aufgestellt wurde.

Die Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze geschah auf Basis der DIN 32645 [160], die Berechnung der Vertrauensbänder auf Basis der DIN 38402 [161]. Die Auswertung der Messergebnisse wurde unter Zuhilfenahme des Programms Dintest[®] 2003 (ein Excel Arbeitsblatt) [162] durchgeführt. Ausreißer wurden durch einen F-Test entsprechend dem Signifikanzniveau von 99 % eliminiert. Die Werte wurden auf Linearität (F-Test nach

Mandel), auf Normal-Verteilung (R/s-Test nach David) und Trend (Neumann-Test) überprüft. Als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde eine Unsicherheit von 1 % (α -Fehler) und als Ergebnisunsicherheit 33,3 % verwendet.

Signal/Rausch-Verhältnisse

Als weitere Methode zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurde das auf Messparametern beruhende Verfahren der Signal/Rausch-Verhältnisse angewandt. Dazu wurden Probenextrakte hergestellt, die mit Antibiotikallösung dotiert wurden (gleiche Proben wie im Unterpunkt Matrixeinfluss). Anschließend wurden per LC-MS/MS die Gehalte in den Proben bestimmt und die Stärke des Signals der Analytsubstanz bei der Detektion mit dem Untergrundrauschen verglichen. Daraus wurden dann die Konzentrationen berechnet, die ein Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 bzw. 10:1 ergeben.

c) Wiederfindungsraten

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten der Anreicherungsmethode 2 (siehe Kap. 3.2.4.1) wurde Leitungswasser mit den neun Antibiotika auf den Niveaus 5, 25, 50, 75 und 100 ng/L dotiert. Je Konzentrationsstufe wurden vier Proben angesetzt und entsprechend der Tab. 13 aufgearbeitet. Die Proben wurden an zwei Tagen hintereinander vorbereitet und angereichert (2 Proben je Konzentrationsstufe an einem Tag), wobei die Dotierungen an den Tagen jeweils mit frisch angesetzten Standardlösungen durchgeführt wurden.

Die hergestellten Extrakte wurden dann per LC-MS/MS gemäß Kap. 3.2.4.2 gemessen und quantifiziert.

d) Varianzen

Um die Streuung von Messwerten bei mehrfacher Bestimmung von Proben zu ermitteln, wurde eine Oberflächenwasserprobe in Vierfachbestimmung untersucht. Dazu wurde ein Gewässer untersucht (Erft), welches mit einem kommunalem Abwasseranteil von etwa 20 % im Jahresdurchschnitt relativ stark belastet ist. Die Proben wurden mit der Anreicherungsmethode 2 aufgearbeitet und per LC-MS/MS auf neun Substanzen gemessen.

3.2.5 Extraktionsversuche (Gülle)

Um Antibiotika aus Gülleproben messen zu können, ist es nötig, die Proben so zu extrahieren, dass möglichst viel der Substanz noch vorhanden ist und die Matrix möglichst wenig stört. Die üblichsten Verfahren, die für Matrices wie Gülle und Boden angewandt werden, sind flüssig/flüssig-Extraktion [83, 129, 137] und die beschleunigte Lösungsmittelextraktion (ASE) [163] (mitunter auch die supercritical fluid extraction (SFE), oder die Mikrowellenextraktion [164, 165]). Werden dabei Extrakte erhalten, die per HPLC gemessen werden sollen, so ist meist aufgrund mitextrahierter Matrix ein weiterer Clean-up Schritt (z.B. SPE) nötig [83]. Sollen die Extrakte allerdings per ELISA vermessen werden, so ist es durchaus möglich, dass sie einfach nur verdünnt werden müssen, wenn der Messbereich des ELISA entsprechend empfindlich ist. Dies spart weitere Aufreinigungsschritte und hat dennoch zur Folge, dass der Matrixanteil so niedrig ist, dass der Test nicht gestört wird.

3.2.5.1 Extraktionstemperatur und Anzahl der Extraktionszyklen

Es wurden die optimalen Bedingungen ermittelt, die für die Extraktion von Sulfadimidin aus Gülle anzuwenden sind. Dazu wurden 7 g Gülle aus Betrieb 1 in 11 mL Edelstahlextraktionszellen gefüllt, die unten mit einem Glasfaserfilter und eingefüllter Hydromatrix³⁸ versehen waren. Auf die eingewogene Gülle wurde weitere Hydromatrix aufgeschichtet und die Zelle verschlossen. Die Zellen wurden verschiedenen Extraktionstemperaturen unterworfen, nämlich 80, 100, 120, 140 und 160 °C. Des Weiteren wurde die Anzahl der Extraktionszyklen von 1 Zyklus à 10 min bis zu 5 à 10 min gesteigert.

Die Extraktion der Proben wurde mit einer ASE 200[®] von Dionex durchgeführt. Als Lösungsmittel wird ein Methanol-Wasser-Gemisch (80:20) verwendet. Die Aufheiz-Phase der Zellen betrug je nach verwendeter Extraktionstemperatur zwischen 5 min bei 80 °C und 7 min bei 160 °C. Des Weiteren wurde ein Spülschritt („Flush“) von 50 % eingestellt, so dass im Anschluss an die Extraktion die Zellen nochmals mit Extraktionsgemisch in einer Menge von 50 % des Zellvolumens durchgespült wurden. Als Zeit, zum Durchblasen der Zelle mit Stickstoff („purge“) nach der Extraktion und dem Spülschritt, wurden 60 Sekunden eingestellt. Die Zellen wurden bei einem Druck von 140 bar extrahiert. Nach jedem Extraktionszyklus wurden die Extrakte einer Probe in einem Auffanggläschen gemeinsam gesammelt. Im Anschluss an die ASE-Behandlung wurden die Extrakte (ca. 8 mL) im

³⁸ Hydromatrix

Diatomeenerde zur Verringerung des Totvolumens

Messkolben auf 100 mL mit Reinstwasser aufgefüllt, so dass in dieser Lösung die gesamte Antibiotikamenge der Proben enthalten war. Zur Messung wurden diese Vorverdünnungen 100fach weiter verdünnt und mittels ELISA (wie in Kap. 3.2.7.1 beschrieben) analysiert.

3.2.5.2 Azideinfluss

In einer weiteren Serie wurde beobachtet, wie der Einfluss von Azid auf die Extraktion und die anschließende Messung wirkt. Dazu wurden Extraktionszellen vor der ASE-Behandlung mit Gülle befüllt (ca. 7-8 g) und mit 5, 10, 50, 100 und 200 µL einer 10 %igen Natriumazid-Lösung versetzt. Bezogen auf die Güllemasse in den Zellen waren dies: 0,0069, 0,0121, 0,0672, 0,1292 und 0,2554 % Azid. Die Zellen wurden mit 3 Zyklen à 10 min bei einer Temperatur von 100 °C, unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben, extrahiert. Anschließend wurden die kompletten Extrakte auf 100 mL mit Reinstwasser aufgefüllt und vor der ELISA-Messung 100fach weiter verdünnt.

3.2.5.3 Wiederfindungsrate, Test-Beeinflussung

Wiederfindungsrate

Um die Extrahierbarkeit von Sulfadimidin zu überprüfen, wurde Gülle mit Sulfadimidinlösung auf verschiedene Konzentrationen dotiert. Dazu wurden ca. 7 g der Schweinegülle aus Betrieb 1 (siehe Kap. 3.1.5.1) in ASE-Extraktionszellen gefüllt und mit 0,3 bis 1,2 mL einer 23 µg/mL Lösung dotiert. Die Zellen wurden nach einigen Stunden per ASE mit 3 Zyklen à 10 min bei 100 °C extrahiert (gleiche Bedingungen wie unter Kap. 3.2.5.1). Nach der Extraktion wurden die Extrakte auf 100 mL im Messkolben aufgefüllt, anschließend zur Messung 1:200 verdünnt und durch 0,2 µm Membranfilter filtriert. Unter Berücksichtigung der Sulfadimidinkonzentration, die aus einer nicht-dotierten Probe unter den gleichen Bedingungen ermittelt wurde, wurden die Grundgehalte in den Dotierungsproben errechnet (da leicht unterschiedliche Mengen eingewogen wurden) und mit den Dotierungen die Sollkonzentration ermittelt.

Test-Beeinflussung

Zur Ermittlung eines Einflusses der Matrix auf die ELISA-Messung wurde der Vergleich angestellt zwischen der Messung von verdünnten Probenextrakten (siehe Wiederfindungsraten) und der direkten Messung von Gülle bei 100facher Verdünnung (nach 10facher

Vorverdünnung). Dazu wurden ca. 10 g Gülle eingewogen, mit Dotierungslösung versetzt (0,3 bis 1,2 mL einer 23 µg/mL SDM-Lösung) und im Messkolben auf 100 mL aufgefüllt. Die Ansätze wurden kräftig geschüttelt. Nach Absetzen der Festbestandteile wurde vom Überstand (mit kolloidalen Bestandteilen) 1 mL entnommen, 100fach verdünnt, und diese Lösung nach Filtration durch 0,2 µm per ELISA gemessen. Aus der Bestimmung einer nicht dotierten Lösung wurde der Grundgehalt ermittelt. Mit den Grundgehalten und den Dotierungsgehalten wurden die Sollkonzentrationen errechnet

3.2.6 Abbauprobversuche und Stabilität von Antibiotika in Böden

Um die Stabilität verschiedener Antibiotika in Böden zu untersuchen und um Extraktionsbedingungen auszutesten, wurden drei Standardböden der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt Speyer mit verschiedenen Konzentrationen an Antibiotika dotiert und unterschiedlich extrahiert. Es handelte sich um Standardböden unterschiedlicher Art, Zusammensetzung und Kohlenstoffgehalte:

Boden 2.1	Sandboden	0,9	%	organischer Kohlenstoff
Boden 2.2	lehmiger Sand	2,3 ± 0,2	%	organischer Kohlenstoff
Boden 2.3	lehmiger Sand	1,2 ± 0,2	%	organischer Kohlenstoff

Zur Dotierung wurden drei verschiedene Konzentrationsstufen verwendet, die den oberen möglichen Bereich eines Antibiotikaeintrags abdecken sollten. Daher wurden die Böden so dotiert, dass Bodenkonzentrationen von etwa 200 µg/kg, 2 mg/kg und 20 mg/kg resultierten.

Um einen möglichen Einfluss von Natriumazid auf den Abbau zu erkennen und somit zu folgern, ob der Abbau primär mikrobiologisch erfolgt, oder durch chemische oder physikalische Prozesse, wurde zusätzlich eine Variante dotiert, aus der eine Konzentration von 2 mg/kg resultierte, bei der aber eine Azidkonzentration von 0,1 % in der Bodenlösung vorliegt.

Da Abbau und Stabilität von Antibiotika getestet werden sollten und nicht allein die Extraktionsoptimierung, wurden die Böden mit der Dotierungslösung 16 Stunden lang bei Raumtemperatur geschüttelt um eine vollkommene Homogenisierung von Bodenmatrix und Lösung zu gewährleisten. Nach dieser Vermischung wurde der Boden langsam bei 35-40 °C

innerhalb von sechs Tagen getrocknet. Nebenbei hatte dies den Vorteil, dass für die Extraktion ein getrockneter Boden vorlag, so dass wirklich nur die Festphase extrahiert wurde. Zur Extraktion wurden drei verschiedene Bedingungen gewählt.

Durchführung:

- 12 g trockenen Boden in 40 mL Glasgefäße mit Deckel füllen
- Dotierung mit 20 mL wässriger Standardlösung, darin enthalten 2, 20 bzw. 200 µg der einzelnen Antibiotika³⁹, bzw. 20 µg + 20 mg Natriumazid
- 16 h am Über-Kopf-Schüttler mit 10 U/min bei 20 °C inkubieren
- Trocknung bei 35-40 °C für sechs Tage
- vollständige Überführung in ASE-Extraktionszellen
- Extraktion mit Methanol:Wasser (80:20), 140 bar, Spülvolumen 50 % des Zellenvolumens, Purgezeit 60 Sekunden, Temperatur + Zeit:

Methode 1:	40 °C	10 min	3 Zyklen
Methode 2:	40 °C	30 min	1 Zyklus
Methode 3:	100 °C	10 min	1 Zyklus

- Entfernung des Methanols aus den Extrakten (größtenteils) am Rotationsverdampfer, 41 °C, 120 mbar
- Überführung des Rückstandes in 1 L Messkolben, Zusatz von 1 mg Na₂EDTA (als Lösung), auffüllen auf 1 L
- SPE an 200 mg LiChrolut[®] EN (gewaschen mit 3 x 2 mL Methanol, konditioniert mit 4 x 2 mL Wasser)
- Säulen waschen mit 2 mL Wasser, unter N₂ trocknen, eluieren mit 4 x 2 mL Methanol
- Eluat eindampfen, aufnehmen in 1 mL Methanol, Messung per HPLC-UV

Als SPE-Material wurde LiChrolut[®] EN verwendet, welches sich bei den SPE-Optimierungen zunächst als bestes Material erwiesen hatte (siehe Kap. 3.2.3.1 und 4.1.2.1). Die Wiederfindungsraten der hier beschriebenen Anreicherungs-methode (ab der Festphasenextraktion) waren zuvor durch Dotierung von Oberflächenwasser (Rhein) mit Sulfonamiden auf den Stufen 1 und 10 µg/L (Tetracycline und Fluorochinolone jeweils 10, 100 µg/L, Penicilline 100, 1000 µg/L) bestimmt worden. Dabei konnten Tetracycline und Penicilline nur zu 10 % wiedergefunden werden können, EFL mit 53 %, CFL mit 33 % die Sulfonamide mit 82 % (SDZ), 97 % (SDM), 98 % (SMX).

³⁹ Dotierung

In der Lösung liegt ein Antibiotikamix vor, in dem Chlortetracyclin, Doxycyclin, Oxytetracyclin, Tetracyclin, Benzylpenicillin, Phenoxymethylpenicillin, Sulfadimidin, Sulfadiazin und Sulfamethoxazol enthalten sind

3.2.7. Standard-ELISA-Testverfahren

3.2.7.1 Testdurchführung

Die hier angewendeten Tests basieren auf dem direkten, kompetitiven Verfahren. Dabei werden die primären Antikörper direkt an die Festphase der Platte immobilisiert. Möglich ist aber auch, dass zunächst ein sekundärer Antikörper an die Wand gebunden wird, an den dann der primäre Antikörper bindet. Das kompetitive Verfahren beruht auf der Konkurrenz des Analyten und markiertem Analyten (Tracer) um die begrenzte Anzahl an Antikörperbindungsstellen. Bei nicht kompetitiven Verfahren liegt keine Konkurrenzsituation vor; hier wird der Analyt komplett an den Antikörper gebunden und mithilfe eines zweiten markierten Antikörpers, der an eine andere, noch freie Seite des Moleküls (bzw. Epitops) angreift, nachgewiesen. Da die untersuchten Substanzen aber zu klein sind, um Andockstellen für zwei Antikörper zu bieten, wird hier der kompetitive ELISA verwendet. Durch die gleichzeitige (oder zeitlich leicht versetzte) Gabe von Analyt und einer konstanten Menge an Tracer in die Kavitäten mit dem gebundenem Antikörper, wird die Konkurrenzsituation ausgelöst. Dabei wird umso mehr Tracer an den Antikörper gebunden (und somit später Farbe entwickelt), je weniger Analyt in der Probe vorhanden ist [49, 143].

Sulfonamide

Im Test werden folgende Arbeitsschritte durchgeführt (Sulfonamide):

Table 18: *Arbeitsschritte zur ELISA-Messung von Sulfadimidin (SDM) und Sulfamethoxazol (SMX)*

Schritt	Durchführung	Material
Vorbehandlung	Sulfadimidin-Serum 3 min bei 14.000 U/min zentrifugieren	Tischzentrifuge
AK-Verdünnung	SDM-Serum 1:40.000 in Coating-Puffer verdünnen SMX-Serum 1:20.000 in Coating-Puffer verdünnen	
Beschichtung	150 µL der Verdünnung in die Kavitäten einer 96er Mikrotiterplatte pipettieren, bei 20 °C über Nacht ständig schütteln	Mikrotiterplatten, Plattenschüttler bzw. -inkubator

Schritt	Durchführung	Material
Waschen	Platten 3 x je Kavität mit 2 mL Waschpuffer waschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, dann Ausschlagen der Platte zur Entfernung von Puffer-Resten	Microplate-Washer
Proben auftragen	100 µL der Proben bzw. Standards in die Kavitäten pipettieren	
Vorinkubation	Platte 10 min schütteln lassen	Plattenschüttler
Tracer-Verdünnung	SDM-Tracer 1:10.000 in PBS-Puffer verdünnen (vorher 3 min bei 14.000 U/min zentrifugieren) SMX-Tracer 1:10.000 in PBS-Puffer verdünnen	Tischzentrifuge
Tracer auftragen	100 µL des Tracers in die Kavitäten geben	
Inkubation	Platte 1 h (SDM), bzw. 45 min (SMX) schütteln	Plattenschüttler
Waschen	Platten erneut 3 x je Kavität mit 2 mL Waschpuffer waschen, um Proben-, Standard- und Tracerlösung zu entfernen, dann Ausschlagen der Platte zur Entfernung von Puffer-Resten	Microplate-Washer
Substrat-Zugabe	150 µL der frisch zubereiteten Substratlösung in die Kavitäten geben	
Entwicklung	Platte 45 min zur Farbentwicklung schütteln	Plattenschüttler
Abstoppen	50 µL Stopp-Lösung in die Kavitäten geben zur Beendigung der Farbentwicklung	
Messung	Nach ca. 2 min Messung der optischen Dichte als Differenzmessung von 450 nm minus 650 nm	Microplate Reader

Streptomycin

Die Bestimmung von Streptomycin erfolgt leicht variiert:

- Zur Beschichtung: Platte über Nacht mit sekundärem anti-Maus Antikörper schütteln (1:1000 verdünnt in Coating-Puffer, 100 µL in jede Kavität)
- Am nächsten Tag Platte ausschlagen (nicht waschen)
- Blockieren der noch freien Bindungsstellen der Platte mit 2 % Casein/PBS-Lösung (200 µL in jede Kavität, 30 min)
- Waschen (3 x je Kavität mit 2 mL Waschpuffer) und Ausschlagen der Platten
- Beschichtung mit primärem Antikörper der Verdünnung 1:4.000 in PBS-Puffer (100 µL in jede Kavität, 1 h bei Raumtemperatur schütteln).

- Waschen (3 x je Kavität mit 2 mL Waschpuffer) und Ausschlagen der Platten
- Proben und Standards auftragen (50 µL, Standards in PBS-Puffer angesetzt)
- Tracer direkt ohne Vorinkubationszeit auftragen (50 µL, Verdünnung 1:10.000 in PBS-Puffer mit 1% Casein)
- Inkubation, 1 h bei Raumtemperatur unter konstantem Schütteln
- Waschen (3 x je Kavität mit 2 mL Waschpuffer) und Ausschlagen der Platten
- Zugabe von Substrat, Farbentwicklung und Messung, wie in Tab. 18 beschrieben

3.2.7.2 Quantifizierung

Die Quantifizierung des ELISA erfolgt durch externe Kalibration. Dazu werden auf jeder Platte gleichzeitig mit den Proben Standards der Konzentrationen 0,001 - 1000 µg/L aufgetragen. Die Messwerte der optischen Dichte (OD) werden gegen die logarithmisch skalierten Konzentrationen aufgetragen. Durch Anpassung an die Punkte erhält man eine sigmoidale Kurve. Zur Auswertung dieser sigmoidalen Kurve kann die 4-Parameter-Gleichung von Rodbard [166] verwendet werden:

Gleichung 3: *4-Parameter-Kurve nach Rodbard*

$Y = \frac{A - D}{1 + (X/C)^B} + D$	<p>Y = Messsignal [OD] A = Maximale OD (asymptotisch) D = Minimale OD (asymptotisch) X = Konzentration [µg/L] B = Steigungsparameter C = Testmittelpunkt [µg/L]</p>
-------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Dabei bezeichnen A und D die obere bzw. untere Asymptote der Kurve und C den Wendepunkt der Kurve. Der C-Wert entspricht der Konzentration, bei der 50 % der, für den Analyten verfügbaren, Antikörperbindungsstellen von diesem besetzt werden. Dies ist bei der Konzentration der Fall, die eine optische Dichte ergibt, die der Hälfte der Differenz aus A- und D-Wert plus dem Sockel des D-Wertes entspricht.

Im Bereich um den Testmittelpunkt hat die Kurve ihren steilsten Bereich, das heißt, dass selbst größere Änderungen in der optischen Dichte nur geringe Konzentrationsänderungen bewirken. Dadurch hat man die höchste Messdynamik, wodurch hier eine Messung von

Proben am genauesten möglich ist. Als grober Anhaltspunkt kann gelten, dass eine Messung bei Konzentrationen von $C \pm$ eine Zehnerpotenz möglich ist. Meist wird als Nachweisgrenze aber die Konzentration des mittleren Nullwertes minus die dreifache Standardabweichung verwendet [143, 167] oder aber die Konzentration des Analyten bei 80-85 % der maximalen Absorption [168, 169].

3.2.7.3 Überprüfung von Tracern und Antikörpern

Mithilfe des sogenannten „Checkerboards“ kann nach Immunisierung oder Synthese eine Überprüfung des Antikörpers oder des Tracers geschehen. Dieser Vortest wird verwendet, um mit den Ergebnissen daraus eine weitere Testoptimierung durchzuführen.

Es wird eine Platte mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen in einer Richtung beschichtet. In einem nicht-kompetitiven Ansatz wird dann Tracer hinzugegeben, ebenfalls in verschiedenen Verdünnungen, aber in anderer Richtung aufgetragen, so dass in einem Schachbrettmuster alle Kombinationen der verwendeten Antikörper- und Tracerverdünnungen vorliegen. Nach der Farbentwicklung kann die Kombination ermittelt werden, bei der mit möglichst starken Verdünnungen dennoch genügend Farbe entwickelt ist. Die Farbintensität ist dabei gleich der Farbintensität bei einem Test, bei dem eine Nullprobe gemessen wird, und würde somit den A-Wert bestimmen.

	Tracerkonz.											
	1:10.000			1:20.000			1:40.000			1:80.000		
Antikörperkonz.												
1:5.000	0,573	0,588	0,585	0,323	0,328	0,329	0,184	0,186	0,190	0,105	0,108	0,109
	0,598	0,596	0,598	0,302	0,335	0,334	0,187	0,190	0,188	0,109	0,110	0,111
1:10.000	0,644	0,656	0,623	0,348	0,346	0,350	0,197	0,200	0,205	0,120	0,123	0,120
	0,580	0,643	0,617	0,356	0,350	0,346	0,202	0,199	0,210	0,120	0,119	0,122
1:20.000	0,478	0,428	0,417	0,250	0,244	0,238	0,143	0,148	0,134	0,081	0,081	0,073
	0,472	0,437	0,464	0,258	0,248	0,239	0,142	0,147	0,141	0,076	0,082	0,088
1:40.000	0,206	0,190	0,175	0,114	0,105	0,105	0,065	0,066	0,066	0,044	0,045	0,043
	0,195	0,189	0,176	0,113	0,105	0,102	0,067	0,48	0,068	0,043	0,040	0,046

Abbildung 9: *Beispiel eines Checkerboards zur Überprüfung der SMX-Tracer-, SMX-Antikörper-Kombination, jeweils in sechsfach-Bestimmung, Angabe der optischen Dichte*

Als Kombination würde sich hieraus eine Antikörper-Verdünnung von 1:10.000 und eine Tracerverdünnung von 1:10.000 zur weiteren Testoptimierung anbieten, da dabei OD-Werte erhalten werden, die für eine Messung ausreichen. Außerdem sind die Verdünnungen relativ hoch, so dass niedrige Testmittelpunkte erwartet werden können.

3.2.8 Tracersynthesen

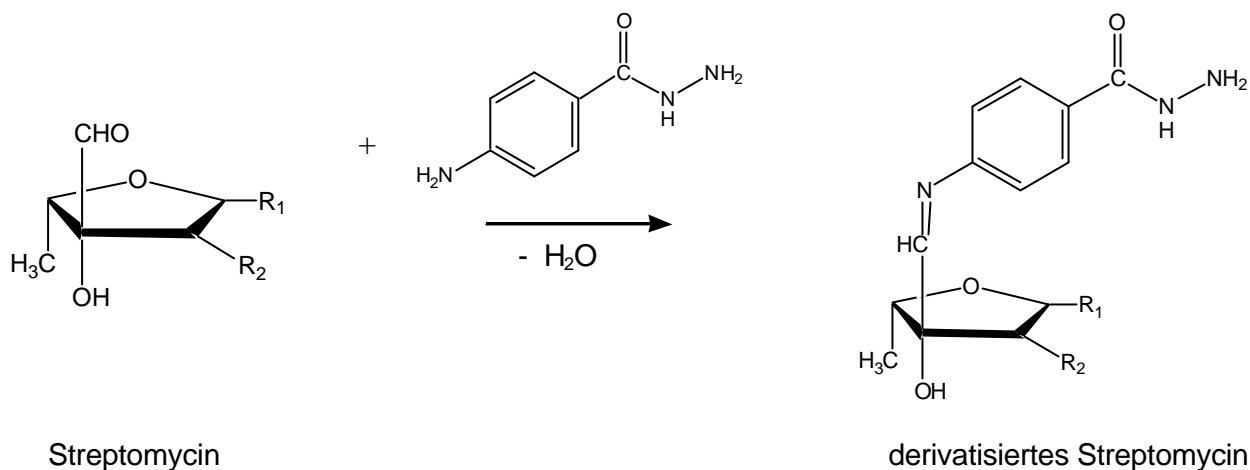
Die im ELISA-Test eingesetzten Tracer bestehen aus dem Analytmolekül (Hapten genannt), das an ein Enzym gekoppelt wird, welches durch Umsetzung eines geeigneten Substrates eine Farbreaktion hervorruft. In den üblichen Tests besteht dieses Enzym aus Peroxidase, gewonnen aus Meerrettich (engl. Horseradish Peroxidase; HRP). Die Kopplung an die Zielmoleküle geschieht dabei meist über ein Molekül, welches als Abstandshalter (Spacer) dient, so dass das kleine Hapten (< 1000 Dalton) nicht durch die HRP (44 kD) abgeschirmt wird. Als kopplungsfähige Gruppe der HRP können freie Aminogruppen (Reste des Lysins oder Arginins) oder auch die Kohlenhydratseitenkette verwendet werden. Eine der üblichsten Techniken besteht in der Herstellung einer Schiffschens Base, also die Reaktion einer primären Aminogruppe mit einer Aldehydgruppe.

3.2.8.1 Streptomycin

STR besitzt eine freie Aldehydfunktion sowie Guanidinreste, die eine endständige Aminofunktion aufweisen. Theoretisch ist eine Kopplung über diese beiden Gruppen mithilfe verschiedener Methoden möglich. Es wurden vier Möglichkeiten der Umsetzung getestet.

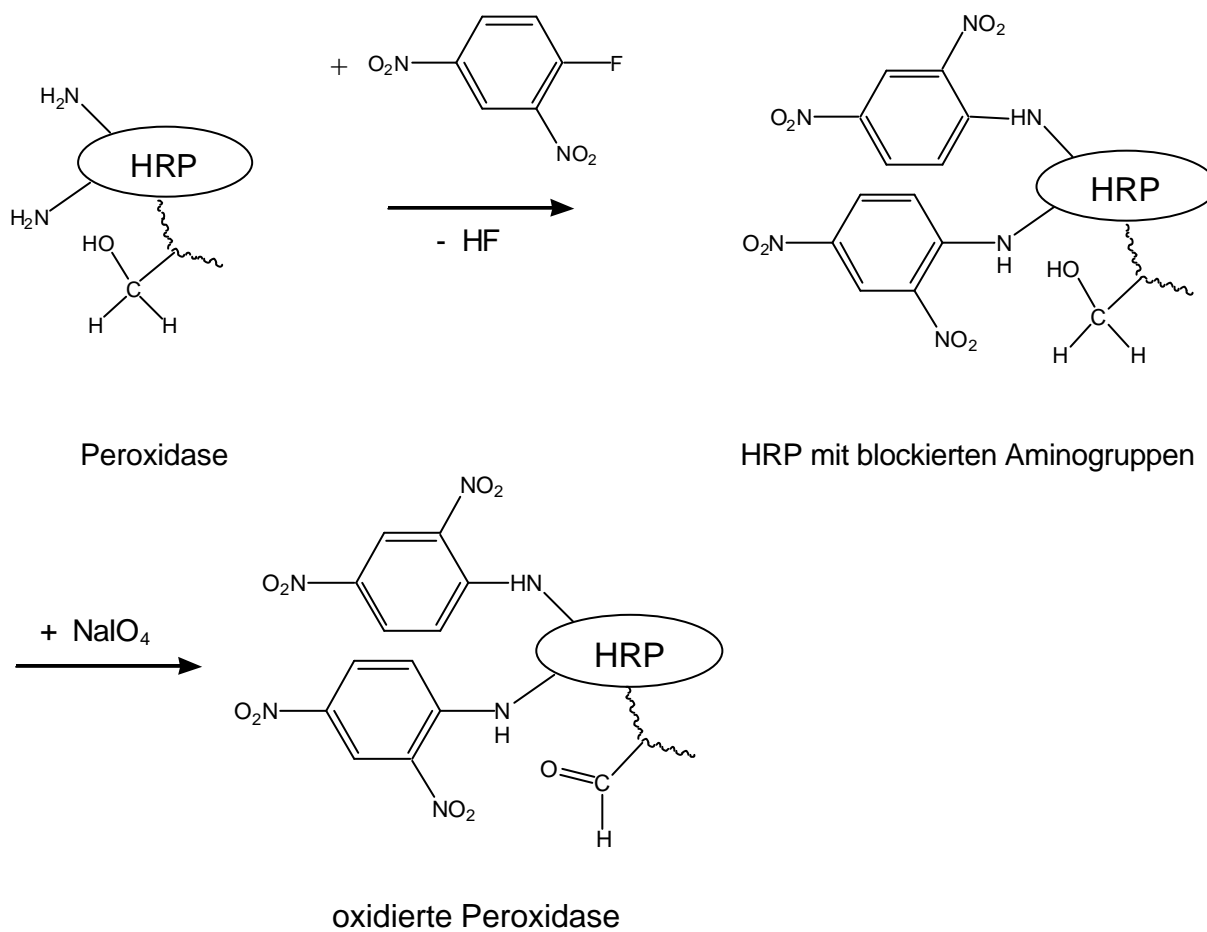
a) Periodat-Methode

Nach einer Methode nach Schnappinger et al. [155] wird hierbei einerseits die Aldehydgruppe des STR mit Aminobenzoessäurehydrazid (ABH) umgesetzt, so dass statt der Aldehyd- nunmehr eine freie Aminogruppe vorliegt.



Reaktion 1: *Einfügung einer Aminofunktion in das Streptomycinmolekül*

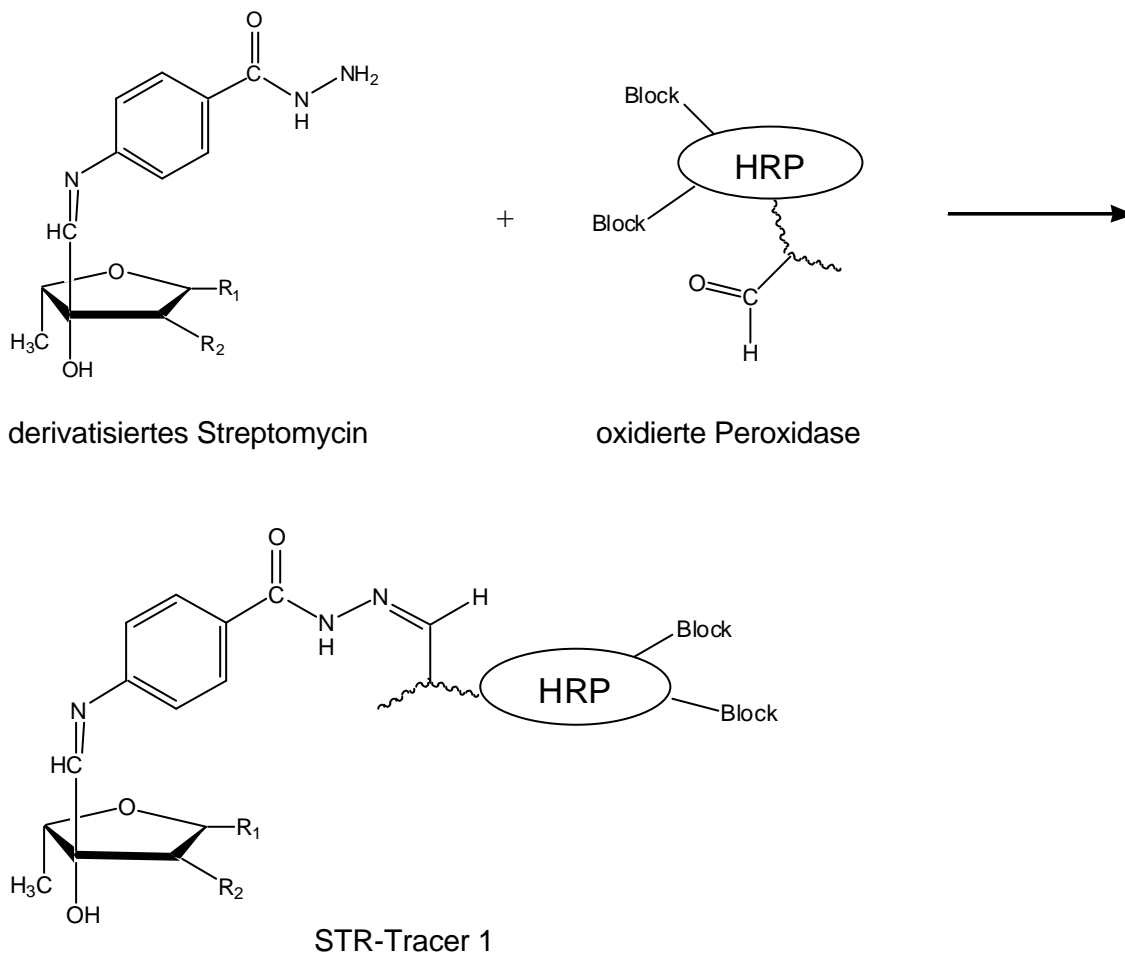
Andererseits wird die HRP nach einer Methode nach Nakane et al. [170] so behandelt, dass sie zugängliche Aldehydgruppen bekommt (siehe Reaktion 2).



Reaktion 2: *Blockierung der Aminofunktionen an der Peroxidase und Oxidation mit Periodat zur Oxidation der Kohlenhydrat-Seitenkette*

Dazu wird die Kohlenhydratseitenkette mit Periodat oxidiert. Um aber zu vermeiden, dass die entstandenen Aldehydgruppen der Kohlenhydratkette mit freien Aminogruppen innerhalb der HRP reagieren, oder aber mit Aminogruppen eines anderen HRP-Moleküls, müssen diese Aminogruppen vor der Oxidation zunächst abgeblockt werden. Diese Inaktivierung der HRP-Aminogruppen geschieht durch Umsetzung mit Fluordinitrobenzol (FDNB).

Im eigentlichen Kopplungsschritt, angelehnt an Schnappinger et al. [155], soll dann die Schiff'sche Base hergestellt werden.



Reaktion 3: *Reaktion von derivatisiertem Streptomycin mit oxidierter Peroxidase*

Durchführung:

1,25 mg HRP (0,03 μmol) wurden in 250 μL Bicarbonatpuffer (0,3 M, pH 8,1) gelöst. Dazu wurden 25 μL einer FDNB-Lösung (1 %ig in Ethanol) gegeben und die Lösung 60 min bei Raumtemperatur gerührt (Blockierungsschritt). Anschließend wurden 250 μL einer wässrigen 0,08 M NaIO_4 -Lösung hinzugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt

(Oxidationsschritt). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 μL Ethylenglycol-Lösung (0,32 M) und weiteres Rühren bei Raumtemperatur gestoppt (Reduktion des überschüssigen Periodates). Danach wurde der Ansatz durch Gelfiltration aufgereinigt, bzw. wurden niedermolekulare Bestandteile abgetrennt. Dies geschieht an Sephadex-Säulen (konditioniert mit 0,01 M Na_2CO_3 -Puffer, pH 9,5), wobei das Filtrat in einer Mikrotiterplatte in Fraktionen von jeweils 4 Tropfen gesammelt wird. Die Platte wird per Photometer bei 405 nm (Extinktionsmaximum der Peroxidase) vermessen, um zu erkennen in welchen Kavitäten sich die aktivierte HRP befindet. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt.

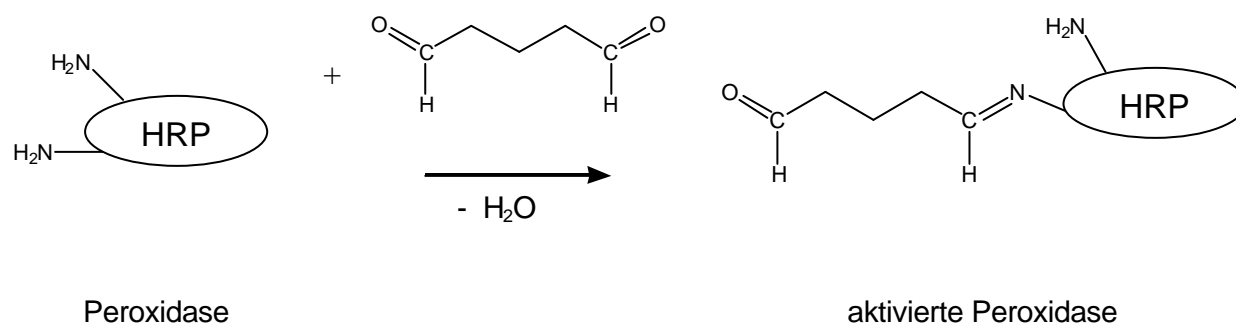
103 mg Streptomycin (0,14 mmol), 1,25 mg ABH (0,008 mmol) und 1,46 mg Natriumacetat wurden in 250 μL dem. Wasser gelöst und eine Stunde bei Raumtemperatur unter Rühren umgesetzt (Einfügen einer Aminogruppe in das STR-Molekül).

Im Kopplungsschritt wurden die 250 μL des STR-Ansatzes zu der gesamten Fraktion der aktivierten HRP gegeben und die Lösung 2 h bei Raumtemperatur unter Rühren umgesetzt. Die Stabilisierung des Produktes geschieht durch Reduktion der Schiffsbasis mit Natriumborhydrid nach der Beschreibung bei Schnappinger et al. [155]. Dazu wurden von einer frisch angesetzten Lösung (10 mg/mL) 250 μL zugegeben und der Ansatz für weitere 2 h bei 4 $^\circ\text{C}$ gerührt. Währenddessen wurde immer wieder Druck im Eppendorf-Cap abgelassen. Schließlich geschah die Aufreinigung des Tracers an Sephadex (konditioniert mit PBS-Puffer). Die Fraktionen wurden erneut in einer Mikrotiterplatte gesammelt und die relevanten Fraktionen vereinigt.

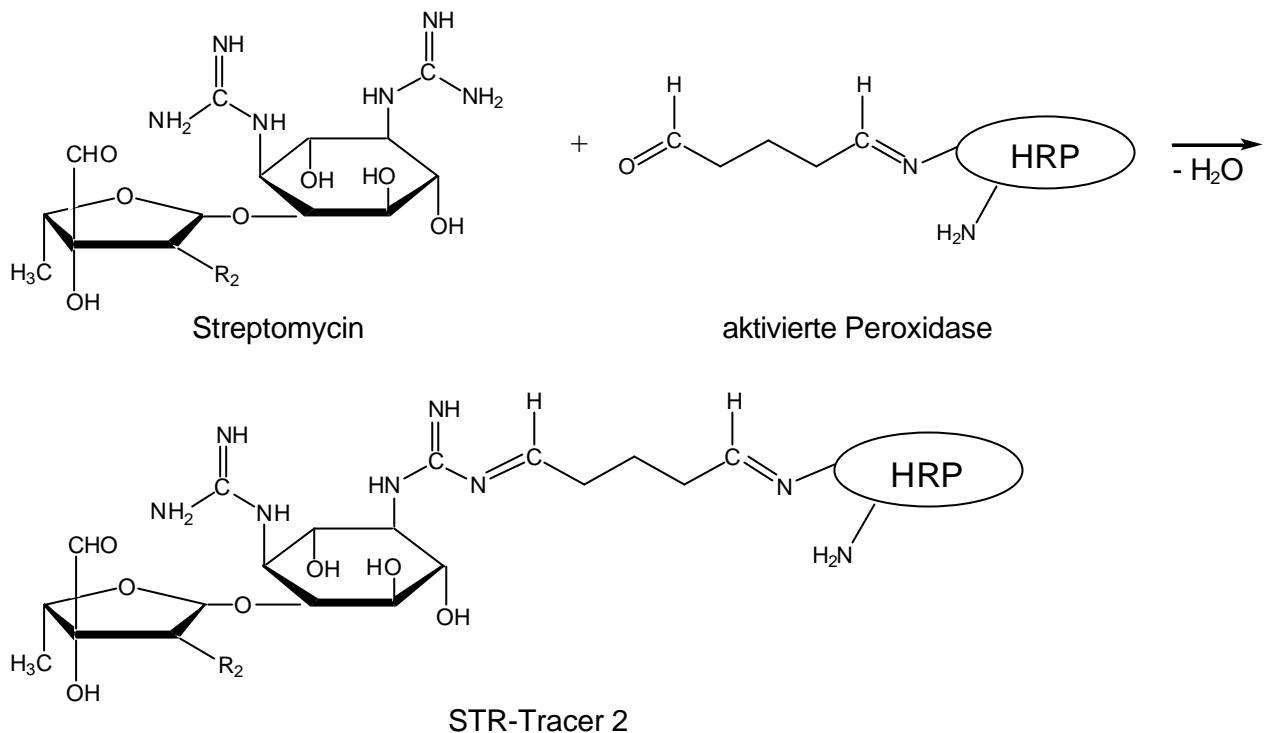
=> Tracer 1

b) Glutaraldehyd-Methode

Diese Methode beruht auf der Umsetzung der Aminogruppen der HRP mit Glutaraldehyd nach Märtilbauer et al. [171], so dass freie Aldehydgruppen entstehen, die anschließend mit den Guanidinfunktionen des Streptomycins umgesetzt werden sollen.



Reaktion 4: *Aktivierung von Peroxidase durch Reaktion mit Glutaraldehyd*



Reaktion 5: *Reaktion von Guanidinfunktionen des Streptomycins mit aktivierter Peroxidase*

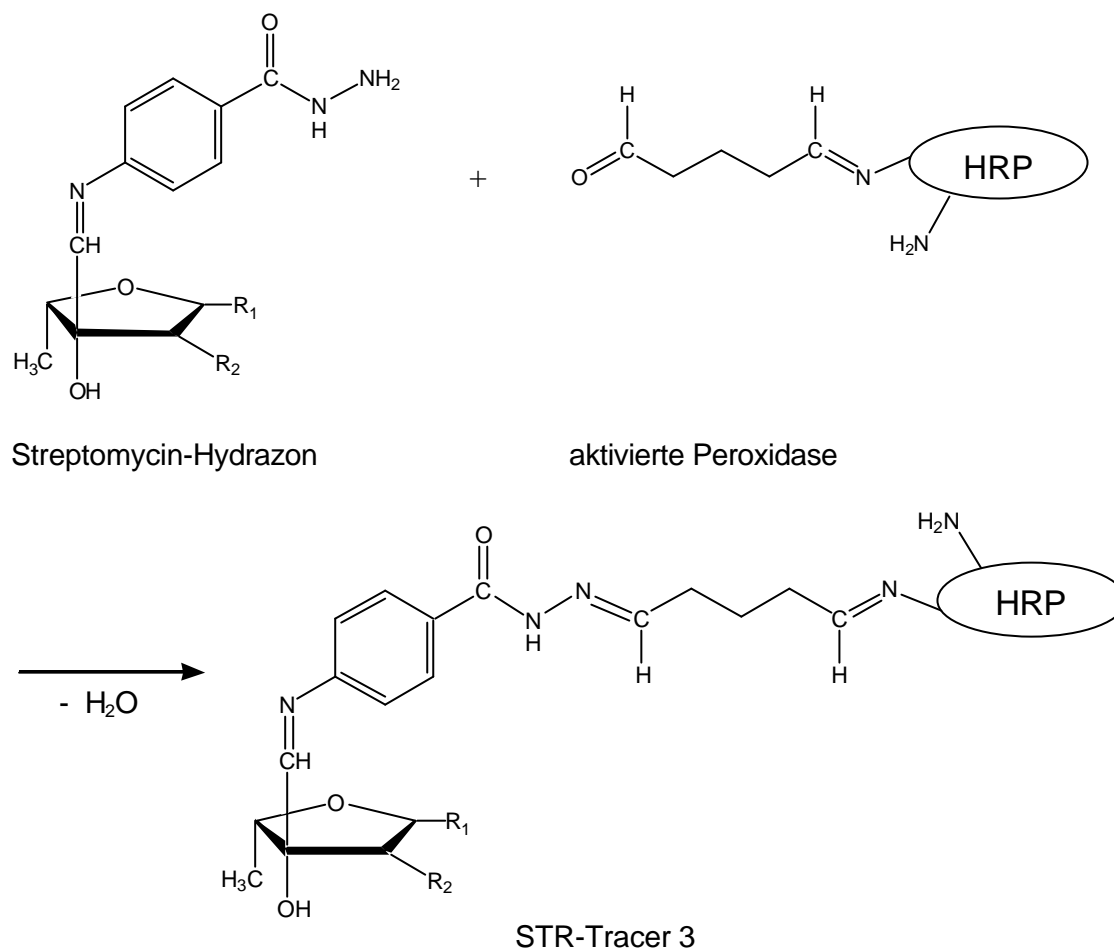
Durchführung:

Es wurde ein PBS-Puffer angesetzt, der 1,25 % Glutardialdehyd enthält. In 200 μL dieses Puffers wurden 2,2 mg HRP (0,05 μmol) gelöst und 18 h bei Raumtemperatur gerührt (Einfügen der Aldehydfunktion). Danach wurde die Lösung an Sephadex (konditioniert mit PBS-Puffer) gereinigt.

1,62 mg STR (2,2 μmol) wurden eingewogen und mit der aktivierten HRP (ca. 1 mL) umgesetzt. Mit 100 μL eines Carbonatpuffers (pH 9,7, Coatingpuffer ohne Azid) wurde der pH-Wert in den alkalischen Bereich gebracht. Die Lösung wurde 23 h bei 4 °C gerührt. Zur Inaktivierung von evtl. nicht gekoppelten Aldehydgruppen der aktivierten Peroxidase, wurden 100 μL einer L-Lysinlösung (0,2 M) zugegeben und weitere 2 h bei 4 °C gerührt [171]. Um die entstandene Schiffsche-Base zu stabilisieren, wurden 250 μL einer NaBH₄-Lösung (10 mg/mL) hinzugegeben und nochmals für 3 h bei 4 °C gerührt (abgeleitet aus den Stabilisierungen nach Schnappinger et al. bzw. Nakane et al. [155, 170]).

Das Produkt wurde an Sephadex (mit PBS-Puffer konditioniert) aufgereinigt. => Tracer 2

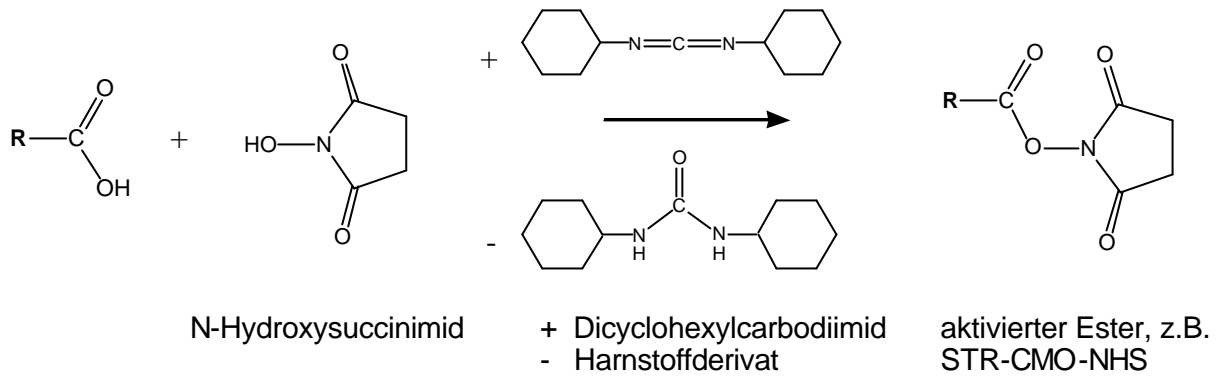
In einem weiteren Ansatz wurde die aktivierte Peroxidase unter den gleichen Bedingungen statt direkt mit Streptomycin mit einem Streptomycin-Hydrazon umgesetzt. Die Bildung des Hydrazons erfolgte ebenso, wie bei der Periodat-Methode beschrieben. => Tracer 3



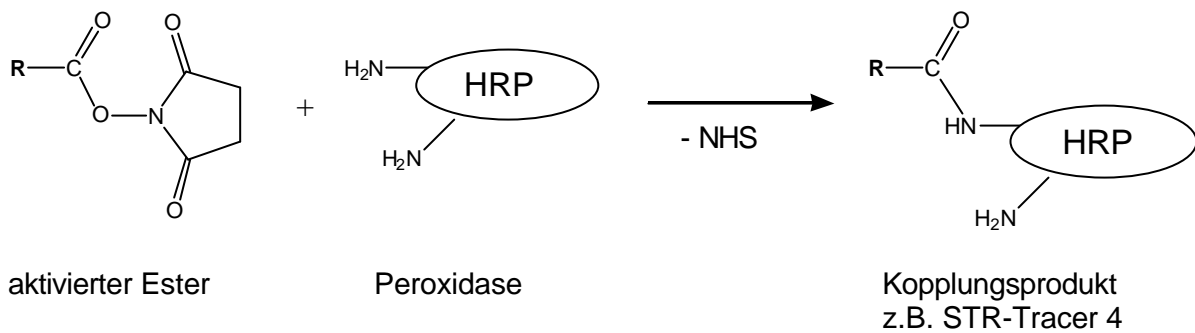
Reaktion 6: *Reaktion der Aminofunktion des Streptomycin-Hydrazons mit aktivierter Peroxidase*

c) Herstellung des CMO-Derivates, Kopplung nach der aktivierten Ester-Methode

Die aktivierte Ester-Methode beruht auf der Umsetzung einer Carboxylgruppe mit einer Aminogruppe, wodurch eine Amidbindung entsteht. Dazu wird die Säuregruppe des Haptens zunächst mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) verestert. Diese Esterbindung ist jedoch nicht sehr stark, sondern dient nur zur Aktivierung der Säuregruppe, damit anschließend die Bildung einer Amidbindung zwischen dem Hapten und Aminoresten der HRP erfolgt.

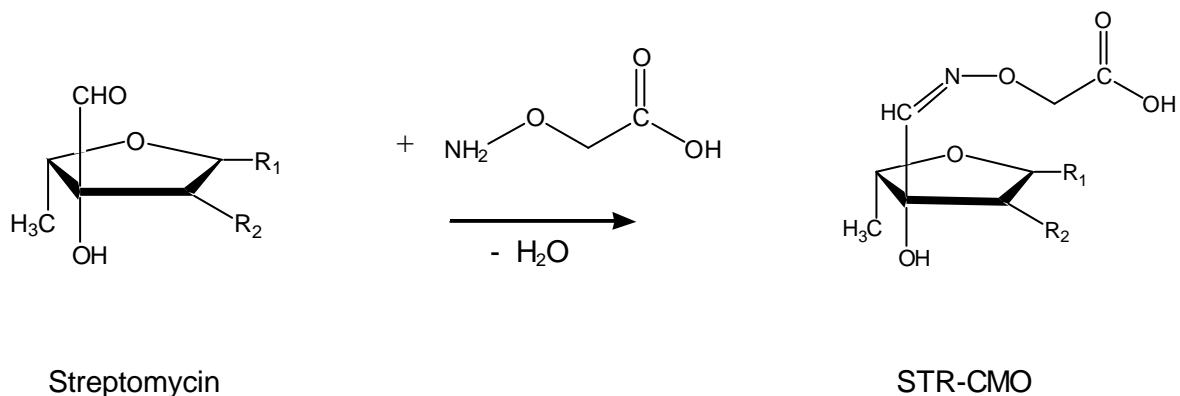


Reaktion 7: *Reaktion der Säurefunktion mit NHS und DCC zum aktivierten Ester*



Reaktion 8: *Kopplung des aktivierten Esters mit den Aminofunktionen Peroxidase*

Da Streptomycin allerdings keine Säurefunktion hat, muss diese erst eingefügt werden, was durch die Umsetzung mit Carboxymethoxylamin (CMO), in Anlehnung an eine Methode nach Schnappinger et al. [155], geschehen soll.



Reaktion 9: *Reaktion von Streptomycin mit Carboxymethoxylamin*

Durchführung:

Es wurden 816 mg STR (1,12 mmol) und 60,2 mg Carboxymethoxylamin Hemihydrochlorid (0,275 mmol = 0,55 mmol des monomeren CMO) in 1,7 mL dem. Wasser gegeben, sowie zusätzlich 8,2 mg Natriumacetat. Die Mischung wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf dem Wasserbad bei 40 °C getrocknet, bis das Wasser aus dem Reaktionsansatz entfernt ist, und das Produkt als gelartige Substanz zurückbleibt.

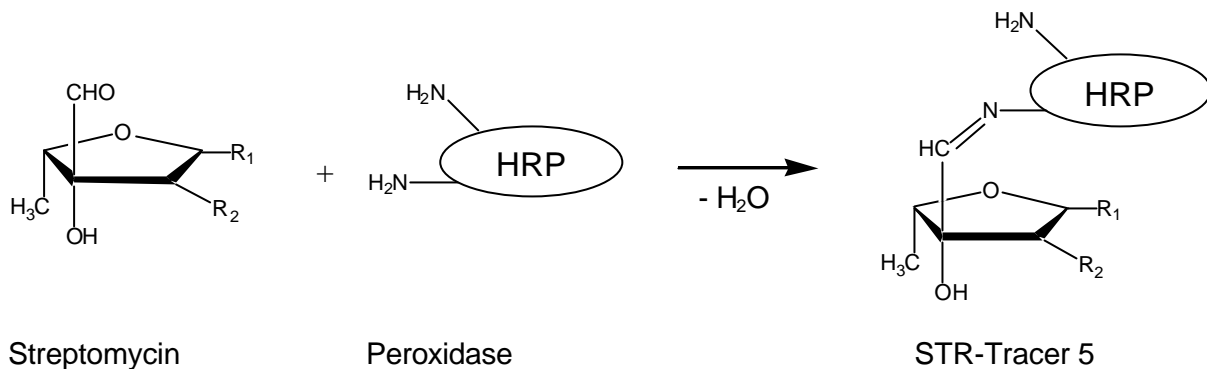
Die Aktivierung und Kopplung geschah in Anlehnung an eine Methode von Fránek et al. [156]. 32,2 mg des STR-CMO-Derivates (49,2 µmol), 5,8 mg NHS (49,2 µmol) und 10,0 mg Dicyclohexylcarbodiimid (DCC, 49,2 µmol) wurden in 600 µL DMF gelöst. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt (Herstellung des aktivierten Esters). Am nächsten Tag wurde die Lösung 10 min bei 14.000 U/min zentrifugiert (Abtrennung des Harnstoffderivates, entstanden aus DCC, welches das Reaktionswasser aufgenommen hat).

1,7 mg HRP wurden in 150 µL Carbonatpuffer (0,13 M) gelöst. In diese Lösung wurden 15 µL des Überstandes des aktivierten Esters pipettiert und das Gemisch 3-4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf eine Sephadex-Säule (zuvor mit 0,01 M Carbonat-Puffer konditioniert) gegeben und so aufgereinigt. Die HRP-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und 1:1 mit Glycerol gemischt. => Tracer 4

d) direkte Umsetzung⁴⁰

Die Periodat-Methode zur Kopplung von STR an HRP basierte auf der Umsetzung der Aldehydgruppe des STR zu einer Aminogruppe und der Einfügung einer Aldehydgruppe in die HRP und Inaktivierung ihre Aminogruppen. Da aber eigentlich beide Moleküle schon von vornherein funktionelle Gruppen besitzen, die miteinander reagieren könnten, wird hier versucht, direkt die Aldehydfunktion des STR mit den Aminofunktionen der HRP im basischen umzusetzen.

⁴⁰ direkte Umsetzung Die direkte Kopplung von Streptomycin an Peroxidase ohne Verwendung eines Spacers ist in der Literatur nach einer durchgeführten Recherche bisher noch nicht beschrieben worden.



Reaktion 10: *Reaktion von Streptomycin mit Peroxidase*

Durchführung:

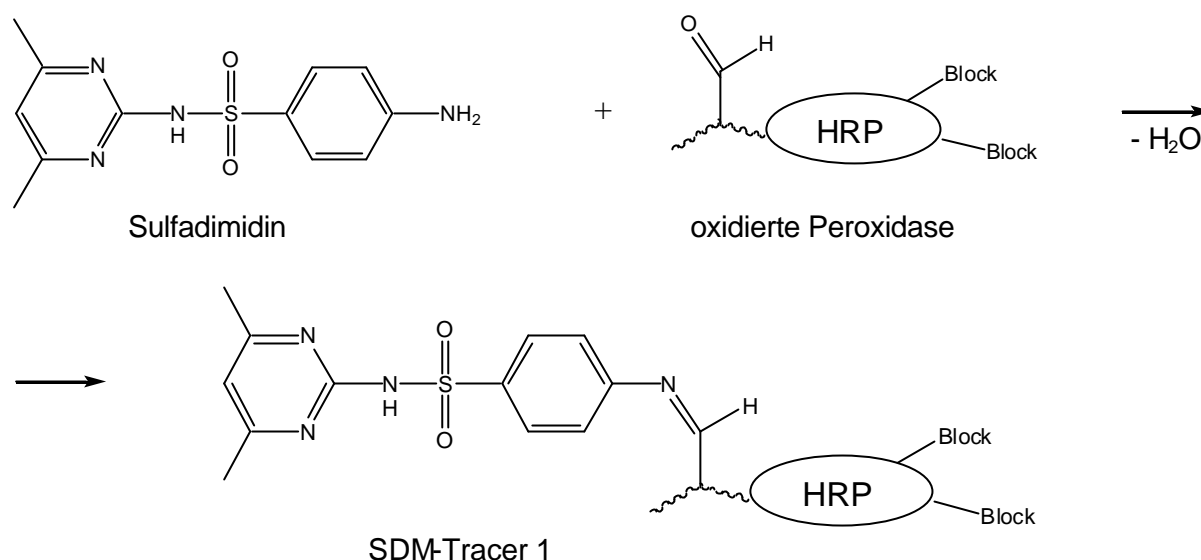
Es wurden 2,2 mg HRP (0,05 μmol = 0,25-0,4 μmol koppelbare Aminogruppen) und 4 mg STR (5,5 μmol) eingewogen und in 200 μL Carbonatpuffer (pH 9,7, Coatingpuffer ohne Azid) gelöst. Das Gemisch wurde vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden zur Stabilisierung der Schiffschen Base 250 μL einer NaBH_4 (10 mg/mL) zugegeben und über Nacht bei 4 °C gerührt, wobei zu Anfang gelegentlich der Überdruck im Eppendorf-Cap abgelassen wurde. Die Lösung wurde schließlich durch Sephadex (mit PBS-Puffer konditioniert) gefiltert. => Tracer 5

3.2.8.2 Sulfadimidin

Sulfadimidin besitzt als frei zugängliche funktionelle Gruppe eine endständige Aminofunktion. Eine Kopplung an HRP ist daher entweder direkt über diese oder nach Derivatisierung möglich.

a) Periodat-Methode

HRP wird nach Inaktivierung der Aminogruppen durch FDNB mit Periodat behandelt, so dass an der Kohlenhydratseitenkette Aldehydfunktionen entstehen (Methode nach Nakane et al. [170], siehe Reaktion 2). Die so aktivierte HRP wird dann im Kopplungsschritt direkt mit Sulfadimidin umgesetzt (Abwandlung der Methode nach Schnappinger et al. [155]) siehe Reaktion 11.



Reaktion 11: *Reaktion von Sulfadimidin mit oxidierter Peroxidase*

Durchführung:

Die Synthese der aktivierten HRP erfolgte genauso wie in 3.2.8.1 a) beschrieben.

Von SDM wurden 39,34 mg (0,141 mmol) eingewogen. Hierzu wurde die gesamte Fraktion des gefilterten HRP-Derivates (in Carbonatpuffer pH 9,5 vorliegend) gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt (Kopplungsschritt).

Die Stabilisierung der Schiff'schen Base und die Reinigung an Sephadex geschahen, wie in 3.2.8.1 a) beschrieben. => SDM-Tracer 1

b) Glutaraldehyd-Methode

Die freien Aminogruppen der Peroxidase (von Lysin und Arginin) werden, nach einer Methode von Märtbauer et al. [171], durch Behandlung mit Glutaraldehyd in endständige Aldehydgruppen mit Spacer umgewandelt (siehe Reaktion 4). Diese werden direkt mit der Aminogruppe des SDM gekoppelt (siehe Reaktion 12).

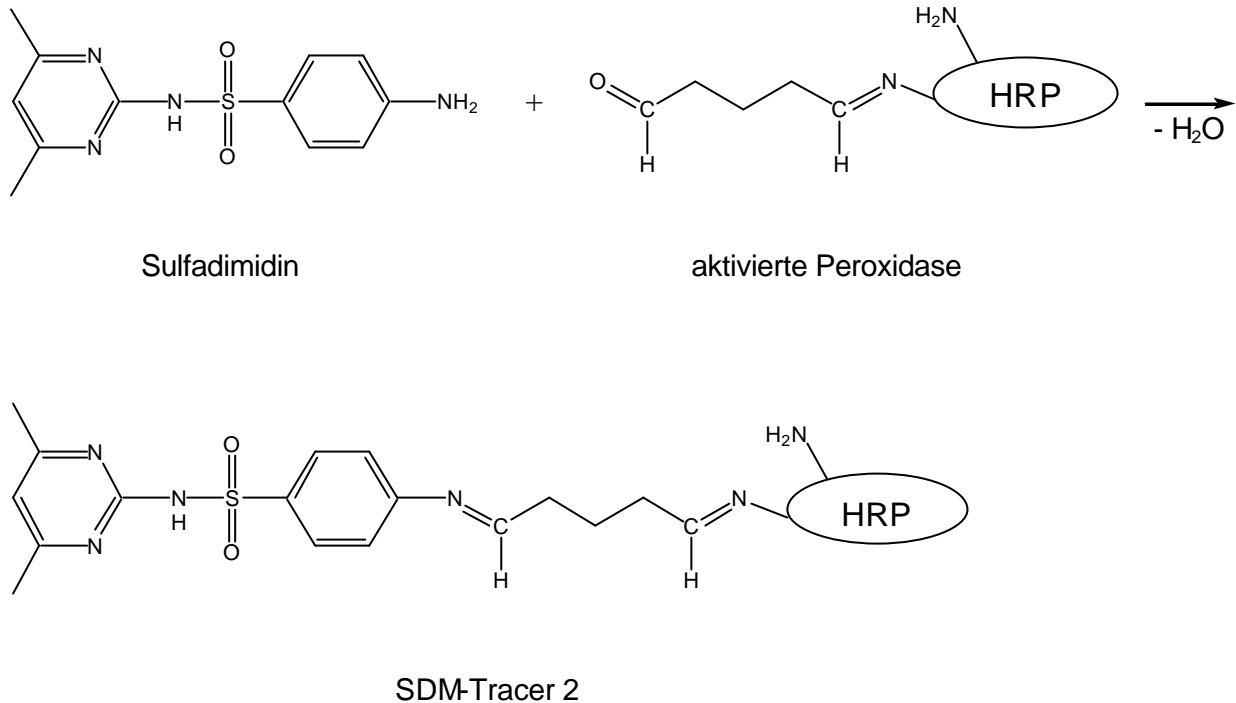
Durchführung:

Die Umsetzung von HRP mit Glutaraldehyd erfolgte analog der Beschreibung in 3.2.8.1 b).

Es wurden 0,60 mg Sulfadimidin (~ 2 μ mol) eingewogen und mit der aktivierten HRP (ca. 1 mL) versetzt. Der pH-Wert wurde durch die Zugabe von 100 μ L eines azidfreien Carbonatpuffers in den alkalischen Bereich gebracht. Es wurde 23 h bei 4°C gerührt. Danach wurden 100 μ L einer Lysin-Lösung (0,2 M) hinzugegeben um nicht gekoppelte

Aldehydgruppen abzusättigen. Dies geschieht 2 h bei 4 °C [171]. Die Stabilisierung der Schiffchen Base und die Reinigung an Sephadex geschahen, wie in 3.2.8.1 b) beschrieben.

=> SDM-Tracer 2

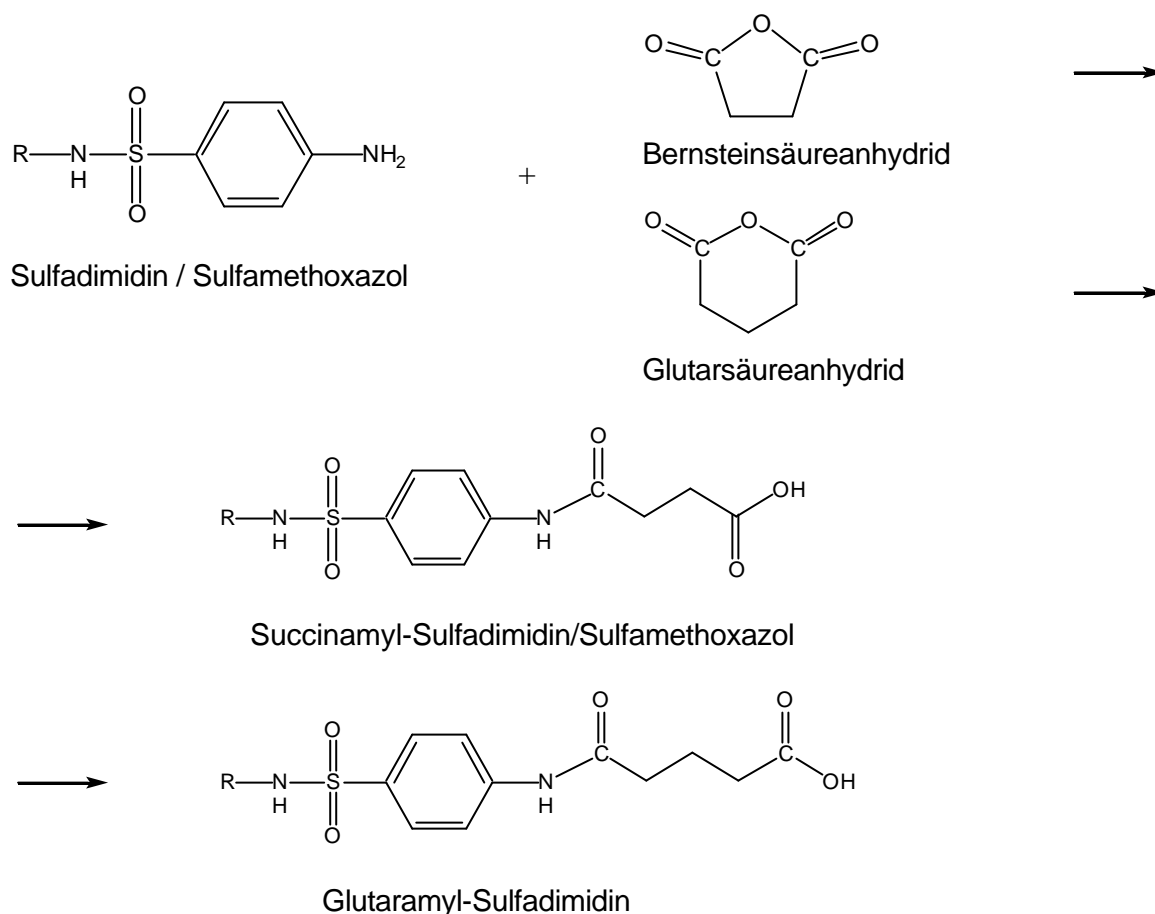


Reaktion 12: *Reaktion von Sulfadimidin mit aktivierter Peroxidase*

c) Herstellung eines Bernsteinsäure-Derivates und eines Glutarsäure-Derivates, anschließende Kopplung nach der aktivierten Ester-Methode

Die N-4-Aminogruppe von Sulfadimidin wird mit Bernsteinsäure und in einem weiteren Ansatz mit Glutarsäure (beides Dicarbonsäuren) umgesetzt, so dass zum SDM-Molekül hin eine Amidbindung entsteht und das Molekül außerdem eine endständige Carbonsäurefunktion erhält (siehe Reaktion 13). Die entstandenen Säuren werden entsprechend der aktivierten Ester-Methode mit NHS und DCC (siehe Reaktion 7) umgesetzt und anschließend gemäß Reaktion 8 an Peroxidase über eine Amidfunktion gebunden.

Die Umsetzung mit den Dicarbonsäuren erfolgt in Anlehnung an die Methode von Haasnoot et al., die aktivierte Ester-Methode in Anlehnung an Fránek et al. [156, 172].



Reaktion 13: *Reaktion von Sulfonamiden mit Carbonsäureanhydriden*

Durchführung:

1 g SDM (3,59 mmol) und 0,5 g Bernsteinsäureanhydrid (5 mmol) bzw. 0,57 g Glutarsäureanhydrid (5 mmol) wurden in ca. 15 mL wasserfreiem Ethanol und 10 µL wasserfreiem Pyridin für 1½ h unter Rückfluss gekocht. Dann wurde der Rückflusskühler entfernt und bis zur Trockne weiter einreduziert. Es wurden 10,5 mL eines Ethanol-Wasser Gemisches (6 mL : 4,5 mL) hinzugegeben und weitere 30 min unter Rückfluss gekocht. Danach wurde auch diese Mischung bis zu Trockne reduziert. Anschließend wurde das Produkt wieder in 10,5 mL der gleichen Mischung aufgenommen, wobei es zum Lösen wieder erhitzt werden musste. In heißem Zustand wurde das Produkt durch eine Glasfritte abgesaugt und das Filtrat in einem verschließbaren Gläschen aufgefangen. Das Produkt kristallisierte über Nacht bei -20 °C aus und wurde am nächsten Tag filtriert, wobei der Filtrerrückstand (das Produkt) mit einer tiefgekühlten (-10 bis -20 °C) Ethanol-Wasser Mischung (6:4,5) gewaschen wurde. Bis zur weiteren Verwendung wurden die beiden Produkte bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Aktivierung wurden 19,0 mg des Succinamyl-SDM bzw. in einem anderen Ansatz 19,3 mg des Glutaramyl-SDM mit 5,8 mg NHS und 10,0 mg DCC eingewogen und in 600 μ L DMF gelöst. Die Lösungen wurden über Nacht bei Raumtemperatur gerührt (Herstellung des aktivierten Esters). Währenddessen bildete sich ein weißer Niederschlag des Harnstoffderivates. Am nächsten Tag wurde die Lösung für 10 min bei 14.000 U/min zentrifugiert.

In zwei Ansätzen wurden 1,7 mg HRP in 150 μ L Carbonatpuffer (0,13 M) gelöst; dazu wurden 15 μ L des Überstandes des NHS-Succinamyl-SDM Ansatzes bzw. 15 μ L des Überstandes des NHS-Glutaramyl-SDM Ansatzes gegeben und die Lösungen 3-4 h bei Raumtemperatur gerührt [156].

Die Reinigung über Sephadex erfolgte analog Kap. 3.2.8.1 c). Zur Lagerung und Aufbewahrung im Gefrierschrank wurden die HRP-haltigen Fraktionen 1:1 mit Glycerol versetzt. => SDM-Tracer 3 (Glutarsäure), SDM-Tracer 4 (Bernsteinsäure)

3.2.9 Entwicklung eines ELISA-Tests zur Bestimmung von SMX

Zur Zeit existiert kein käuflicher Test zur immunchemischen Bestimmung von Sulfamethoxazol. Ebenso sind auch SMX-Antikörper weder als polyklonales Serum, noch als monoklonale Antikörper kommerziell verfügbar oder in Datenbanken zu finden. Daher sollte hier ein Test vollständig entwickelt werden, ausgehend von Immunogensynthese, Immunisierung und Herstellung des Tracers. Zur Kopplung von Sulfamethoxazol an ein Trägerprotein bzw. an Peroxidase, sollte das Verfahren angewandt werden, welches auch zur Kopplung von Sulfadimidin sich als am Besten erwies (siehe Kap. 3.2.8.2 c).

Da Sulfamethoxazol vom Molekulgewicht her deutlich zu klein ist ($M = 253,3$ g/mol), um eine Immunantwort hervorzurufen und daher auch die Antikörperproduktion im Tier nicht anregen kann, ist es erforderlich, das Hapten an ein Trägerprotein zu binden (das Kopplungsprodukt ist dann das Immunogen). Primär bildet das Tier, welchem das Immunogen injiziert wurde, nun Antikörper gegen Strukturen des Proteins, welches ja aufgrund seiner Molekülmasse von mehreren Tausend Dalton (bei KLH⁴¹ sogar 8-9 Mio. Da) viel eher als fremd angesehen wird. Es werden aber auch Antikörper gegen die gebundene Struktur des Haptens gebildet, sowie gegen die Spacerbrücke, also den Molekülteil, über den das Hapten an das Protein gekoppelt ist. Man erhält also einen Mix vieler verschiedener Antikörper, von denen einige auch gegen das Zielmolekül gerichtet sind [173].

⁴¹ KLH

Keyhole Limpet Hemocyanin, Hämocyanin von *Megathura crenulata*,

3.2.9.1 Synthese eines Bernsteinsäurederivates als Vorstufe

Die Bindung von Sulfamethoxazol an ein Protein geschieht, wie bei der Tracersynthese von Sulfadimidin, über ein Zwischenprodukt, welches aus SMX und daran gebundener Bernsteinsäure besteht. Dieses funktionalisierte SMX (es wurde eine Säurefunktion ins Molekül eingefügt, siehe Reaktion 13) wird isoliert und kann sowohl zur Tracer- als auch zur Immunogensynthese eingesetzt werden. Die Synthese des Succinamyl-SMX⁴² erfolgt jedoch etwas anders als bei SDM, in Anlehnung an eine Methode nach Tataka et al. [174].

Durchführung:

1,01 g SMX (3,99 mmol) wurden mit 14 mL wasserfreier Essigsäure unter Rühren auf 60 °C erhitzt. Dazu wurden 0,44 g Bernsteinsäureanhydrid (4,4 mmol) gegeben und die klare Reaktionslösung weiter bei 55-60 °C erhitzt und gerührt. Nach etwa 12-15 Minuten fiel ein voluminöses weißes Reaktionsprodukt aus. Die Lösung wurde mit 3 mL wasserfreier Essigsäure etwas verdünnt und für weitere 25 Minuten bei dieser Temperatur belassen. Anschließend wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und durch eine Glasfritte abgesaugt. Der Rückstand wurde mit etwas Essigsäure und danach mit warmem Wasser gewaschen und über Silikagel getrocknet.

Das Produkt, sowie der aktivierte Ester davon (zur Aktivierung siehe Kap. 3.2.9.2) wurden per HPLC-UV nach der in Kap. 3.2.2 beschriebenen Methode für Sulfonamide untersucht. Des weiteren wurden von ihnen bei permanenter Injektion der Probelösung, ohne Trennung an einer HPLC-Säule, Massenspektren mit einem Ionenfallen LC-MSⁿ (LCQ, ThermoFinnigan) aufgenommen. Dazu wurden die Substanzen in Methanol : Wasser (50:50) aufgenommen und mit etwas Essigsäure angesäuert. Der aktivierte Ester (in DMF vorliegend) wurde in Methanol : Wasser verdünnt und angesäuert.

3.2.9.2 Kopplung an Peroxidase (Tracer-Synthese)

Um zu erkennen, ob die Einfügung einer Säuregruppe ins SMX-Molekül stattgefunden hatte und eine weitere Kopplung überhaupt Erfolg versprechend sein konnte, was für eine Immunisierung entweder das Gelingen oder Misslingen bedeutet hätte, wurde zunächst dieses Zwischenprodukt mit Peroxidase zu einem Tracer umgesetzt. Es lag zwar zu diesem

⁴² Succinamyl-SMX Trivialbezeichnung, eigentlich N-4-(3-Carboxypropanoyl)-Sulfamethoxazol

Zeitpunkt noch kein Antikörper gegen SMX vor, der auch einen SMX-Tracer spezifisch binden würde, aber die Testung eines SMX-Tracers ist auch mit dem Sulfadimidin-Test möglich. Hier sollte die Kreuzreaktivität des Sulfadimidin-Antikörpers auf Sulfamethoxazol ausgenutzt werden. In vorherigen Versuchen konnte erkannt werden, dass eine gewisse Kreuzreaktivität des SDM-Antikörpers gegen SMX besteht, die zwar sehr gering (0,002 % molare Kreuzreaktivität, siehe Abb. 31), aber dennoch spezifisch ist. Wird nun einfach statt eines SDM-Tracers ein synthetisierter SMX-Tracer eingesetzt, so erkennt man bei einer Farbreaktion, dass eine Bindung des Tracers stattgefunden hat, die bei Auftreten einer Testkurve spezifisch ist, dass auch die Kopplung von Succ-SMX an Peroxidase erfolgreich war und somit auch das Zwischenprodukt wirklich vorliegt. Als Standardreihe können in einer solchen Testung sowohl SDM, als auch SMX eingesetzt werden. Aufgrund der schwachen Kreuzreaktivität ist es allerdings erforderlich, dass die SMX-Tracerkonzentration recht hoch ist:

1. damit überhaupt ein Teil an die Antikörper gebunden wird, so dass eine genügende Farbentwicklung erfolgen kann, bzw.
2. um eine Verdrängung des SDM von den Antikörperbindungsstellen zu gewährleisten.

Die Synthese des Tracers folgt dabei der aktivierten Ester-Methode (siehe Reaktionen 7, 8), abgeleitet von der Methode von Fránek et al. [156], angewendet in Kap. 3.2.8.2 c auf Sulfadimidin.

Durchführung:

Wie bei SDM beschrieben, wurden 17,4 mg des getrockneten Succinamyl-SMX (entsprechen 49,2 μmol , wenn es ein reines Produkt wäre) mit 5,8 mg NHS (49,2 μmol) und 10,0 mg DCC (49,2 μmol) eingewogen und in 600 μL DMF gelöst. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es bildete sich dabei ein weißer Niederschlag des beschriebenen Harnstoffderivates. Am nächsten Tag wurde die Lösung für 10 min bei 14.000 U/min zentrifugiert und der Überstand weiter verwendet. (\Rightarrow aktivierter Ester des SMX)

Die Kopplung von 15 μL der Lösung des aktivierten Esters erfolgte analog zu Kap. 3.2.8.2 c, ebenso die Reinigung. Der Tracer wurde zur Lagerung 1:1 mit Glycerol verdünnt und im Gefrierschrank aufbewahrt.

Der synthetisierte Tracer wurde in einem ELISA-Testformat für SDM getestet (Bedingungen siehe Kap. 3.2.7.1). Dabei wurde eine SDM-Antikörperverdünnung von 1: 40.000 eingesetzt,

SDM-Standards von 0,001-1000 µg/L und SMX-Tracerverdünnungen von 1:100, 1:1.000 und 1:5.000.

3.2.9.3 Kopplung an KLH (immunogen-Synthese)

Üblicherweise werden als Carrier-Proteine zur Immunisierung bovines Serumalbumin (BSA), humanes SA, Ovalbumin oder KLH eingesetzt [156, 172], wobei KLH meist sehr gute Ergebnisse liefert [175], weshalb auch hier die Kopplung an KLH verfolgt werden sollte. Die Kopplung sollte wieder basierend auf der aktivierten Estermethode nach Fránek et al. [156] geschehen. Daher sind die Syntheseschritte bis zu dem Zwischenprodukt des aktivierten Esters des SMX vollkommen identisch mit der Synthese des Tracers (siehe Kap. 3.2.9.2).

Zur eigentlichen Kopplung wurden folgende Überlegungen angestellt:

Bei der Tracersynthese nach Fránek et al., und hier auf Succ-SMX angewandt, liegt zwischen diesem und HRP (siehe Kap. 3.2.9.2) ein molares Verhältnis von 32,2:1 vor. Berücksichtigt man eine Anzahl von 1-3 Aminogruppen an der Peroxidase, die mit der einen Säurefunktion pro Succ-SMX Molekül koppeln können, so liegt ein Verhältnis von 10-30:1 vor. Nach Kopplungsversuchen von NHS-Succ-SMX an HSA konnten Tataka et al. [174] mit einem Verhältnis von 8:1 (Stoffmenge NHS-Succ-SMX : Stoffmenge koppelbarer Aminogruppen am HSA) die höchste Kopplungsdichte am Protein erreichen, die 35 % betrug. Da eine hohe Kopplungsdichte für eine Immunisierung sehr vorteilhaft ist, wurde dieses molare Verhältnis auf die Kopplung an KLH ebenfalls angewandt. KLH ist ein Glycoprotein mit einem Zuckeranteil von ca. 5 %. Es besteht aus 20 Untereinheiten, die Molekülmassen von 350-390 kDa haben. Diese Untereinheiten lassen sich in weitere acht globuläre Einheiten von jeweils etwa 50 kDa zerlegen [176]. Basierend auf einem Gehalt von 67 Aminogruppen aus Lysin an einer Untereinheit, enthält ein Molekül KLH 1340 Aminogruppen [177]. Zur Immunisierung von Kaninchen werden vom eigentlichen Hapten (SMX) etwa 200-300 µg benötigt, die an ein Trägerprotein gekoppelt sind und in 4 Injektionen innerhalb von 3 Monaten gegeben werden [178]. Erreicht man eine Kopplungsdichte von einem Drittel der Aminogruppen, so muss man etwa 15 mg KLH als Edukt einsetzen, um etwa 0,2 mg an SMX gebunden vorliegen zu haben. Wird eine Dichte von 50 % erreicht, so wären es sogar 0,3 mg SMX.

Durchführung:

Succ-SMX wurde entsprechend der Beschreibung in Kap. 3.2.9.2 mit NHS aktiviert (siehe Reaktion 7), und der Überstand der Lösung weiter verwendet. Da 15 mg an KLH umgesetzt werden sollten, waren bei einem achtfachen molaren Überschuss des aktivierten Esters davon 9,053 mg, bzw. 245 μL des Überstandes in DMF erforderlich. Da die eigentliche Kopplung gemäß Fránek et al. in 0,13 M Carbonatpuffer geschieht (150 μL , s.o.), in den ein Zehntel des Volumens von der DMF-Lösung gegeben werden (15 μL), sollten diese Verhältnisse auch hier beibehalten werden. Das heißt, dass das Volumen an Carbonatpuffer, in dem die 15 mg KLH vorliegen das zehnfache der 245 μL Überstand sein muss. Das KLH liegt als Lyophilisat von 20 mg vor, welches zusätzlich noch Phosphat-Puffersalze enthält. Die gesamte Menge wurde in 3,26 mL des 0,13 M Carbonatpuffers gelöst. Davon wurden 2,45 mL genommen und in einem Eppendorf-Cap gerührt. Dazu wurden 245 μL des Überstandes gegeben und die Mischung 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Produkt (der gesamte Ansatz) über eine Sephadex PD 10 Säule (zuvor mit 0,01 M Carbonatpuffer konditioniert) aufgereinigt und in eine Mikrotiterplatte hinein gelfiltriert. Optisch waren die Kavitäten, in denen die proteinhaltigen Fraktionen vorlagen, lediglich an einer schwachen Trübung zu erkennen, die auch im Photometer nur bedingt zu sehen war. Daher wurden die Kavitäten mithilfe des Bradford-Tests auf Protein überprüft. Die identifizierten Kavitäten mit dem Kopplungs-Produkt wurden vereinigt, (nicht mit Glycerol vermischt!) und unter Kühlung an das Labor zur Immunisierung geschickt.

Außer den Lösungen aus den Kavitäten der Mikrotiterplatte nach der Gelfiltration wurde auch das Produkt vor der Gelfiltration auf den Proteingehalt untersucht. Zum Vergleich wurde das Edukt KLH (ohne Succ-SMX) untersucht, um eine Aussage über dessen Veränderung zu erhalten. Bei letzterem Test war zu der KLH-Lösung in Carbonatpuffer (0,13 M) ein Zehntel des Volumens an DMF zugegeben worden, um gleiche Bedingungen zu haben, wie sie in der Produktlösung vorlagen. Anhand einer externen Kalibration mit Referenzlösungen konnte bestimmt werden, wie hoch die Proteinkonzentration in den Proben war.

3.2.9.4 Immunisierung

Die Immunisierung eines White New Zealand Rabbit mit dem KLH-Kopplungsprodukt wurde in Göttingen durch die Firma SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt und folgte dem Standard-Schema (3 Monate) zur Immunisierung:

Tag	0	1. Injektion (Präimmunserum > 5 mL)
	21	2. Injektion
	35	1. Blutabnahme (10-20 mL)
	49	3. Injektion
	63	2. Blutabnahme (10-20 mL)
	77	4. Injektion
	98	Entblutung (> 50 mL)

Die erhaltenen Seren wurden getestet, indem in einem Checkerboard (siehe Kap. 3.2.7.3) sowohl verschiedene Antikörper-Konzentrationen, als auch verschiedene Tracerkonzentrationen ausgetestet wurden. Es wurde die Kombination abgelesen, die eine möglichst starke Verdünnung zulässt und dennoch einen ausreichenden Wert der optischen Dichte bringt. In einem Testformat wurde dann mit dieser Kombination die Testqualität bestimmt, indem eine Standardkurve erstellt, die Kreuzreaktivität gegen andere Sulfonamide getestet, sowie die Nachweisgrenze berechnet worden ist.

3.2.10 Untersuchung von Gülle- und Bodenproben

3.2.10.1 Betrieb 1

ELISA-Messung - Gülle

Die Gülleprobe (ca. 8 g Einwaage) wurde per ASE bei 100 °C mit drei Zyklen à 10 min mit Methanol : Wasser (80:20) extrahiert. Die Aufheizphase der Zellen betrug dabei 5 min. Weitere Einstellungen, wie Spülschritt, Ausblaszeit und Druck sind Kapitel 3.2.5.1 zu entnehmen.

Der Extrakt von ca. 8 mL wurde auf 100 mL mit Reinstwasser aufgefüllt und zur Messung auf Sulfadimidin per ELISA 1:100 verdünnt und durch 0,2 µm filtriert. Die Testdurchführung erfolgte, wie in Kap. 3.2.7.1 beschrieben. Zur Berechnung des Messwertes wurde die Wiederfindungsrate des Verfahrens (siehe Kap. 3.2.5.3 in Verbindung mit Kap. 4.1.4.3) von 111 % berücksichtigt.

ELISA-Messung - Boden

Die einzelnen Bodenteilproben (von einer Fläche, auf der Gülle des gleichen Typs ausgebracht worden war), wurden nach dem Auftauen vereinigt und homogenisiert. Zur Bestimmung der Trockenmasse geschah eine Trocknung bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz. Zur Extraktion wurde sowohl die natürlich feuchte Bodenprobe verwendet, als auch die bei 105 °C getrocknete. In Anlehnung an die Folgerungen aus Kap. 4.1.5.2 wurde die Extraktion per ASE (ca. 10 g Einwaage des feuchten Bodens, ca. 8 g des getrockneten) bei 100 °C mit drei Zyklen à 10 min mit Methanol : Wasser (80:20) durchgeführt.

Da Versuche zum Matrixeinfluss der ELISA-Messung (Kap. 3.2.5.3 und 4.1.4.3) ergaben, dass zur Messung von ASE-Extrakten auf Sulfadimidin lediglich eine Verdünnung der Extrakte erforderlich ist, wurde keine besondere Matrixabtrennung vorgenommen. Vom ASE-Extrakt wurde der Methanol-Anteil am Rotationsverdampfer bei 42 °C und 120 mbar weitestgehend entfernt⁴³, und der wässrige Rest im 50 mL Messkolben mit Reinstwasser

⁴³ Methanol-Gehalt

Bei der Probenvorbereitung der Bodenproben war eine Abtrennung des Methanols erforderlich, da der ASE-Extrakt (~ 7 mL) nur in 50 mL aufgenommen wurde und darin der Methanolgehalt ansonsten 10 % betragen hätte, der die Messung erheblich beeinflusst hätte. Bei der Gülle war ein solcher Schritt nicht nötig, da der ASE-Extrakt zunächst auf 100 mL aufgefüllt und dann 100fach verdünnt wurde (Methanol-Gehalt dann weniger als 0,1 %).

aufgefüllt. Vor der ELISA-Messung gemäß Kap. 3.2.7.1, wurde der verdünnte Extrakt durch 0,2 µm filtriert.

3.2.10.2 Betrieb 2

Die Rindergülleprobe von Betrieb 2 wurde ohne ASE-Extraktion untersucht. Statt der gesamten Gülle mit der Feststoffmatrix wurde dabei nur der wässrige Anteil erfasst, der aber ohnehin den größten Teil ausmachte. Dies war möglich, da in vorherigen Versuchen (beschrieben in Kap. 3.2.5.3 und Kap. 4.1.4.3) erkannt wurde, dass auch die direkte ELISA-Bestimmung von Sulfadimidin in einer Gülle ohne vorherige Extraktion möglich ist.

Es wurden 10 g eingewogen, auf 100 g mit Reinstwasser ergänzt und für 5 min im Ultraschallbad behandelt. Nach dem Absetzen der festen Bestandteile wurde ein Aliquot des Überstandes nochmals 100fach verdünnt (insgesamt 1:1000) und per ELISA (siehe Kap. 3.2.7.1) auf Sulfadimidin gemessen⁴⁴.

3.2.10.3 Betrieb 3

ELISA-Messung - Gülle

Von der Rinder- und die Schweinegülleprobe aus Mai 2002 wurden nur die wässrigen Phasen ohne ASE-Extraktion betrachtet. Die Aufarbeitung und Messung auf Sulfadimidin erfolgte, wie im vorherigen Kap. 3.2.10.2 beschrieben.

Bei den Rinder- und Schweinegülle bzw. der Mischgülle und Jauche aus Januar 2003 wurde ebenfalls nur die wässrige Phase betrachtet, bzw. der Anteil, der sich mittels Ultraschall extrahieren ließ. Dazu wurde 1 g der Gülle genommen, und mit Reinstwasser auf 10 mL ergänzt. Diese Vorverdünnung wurde für 5 min im Ultraschallbad behandelt. Nach Absetzen der festen Bestandteile wurde anschließend 1:100 bzw. 1:1.000 verdünnt, so dass für die ELISA-Messung auf Sulfadimidin eine insgesamt 1.000fache und eine 10.000fache Verdünnung vorliegt (zur Testdurchführung siehe Kap. 3.2.7.1). Die Korrektur der Ergebnisse (auch bei den Bodenlösungen) erfolgte mit der Wiederfindungsrate des Verfahrens (siehe Kap. 3.2.5.3 in Verbindung mit Kap. 4.1.4.3) von 96,9 %.

⁴⁴

Die hier erhaltenen Ergebnisse, die sich aus der direkten Messung der Verdünnung ergeben, wurden mit der in Kap. 3.2.5.3 in Verbindung mit Kap. 4.1.4.3 ermittelten WDF von 96,9 % dieses Verfahrens verrechnet.

ELISA-Messung - Boden

Von den Bodenproben aus Januar 2003 wurde bei der Vorbereitung zur ELISA-Messung ebenfalls nur die wasserlösliche Phase betrachtet. Dazu wurden 100 g des feuchten Bodens entnommen, mit 200 mL Wasser aufgeschlämmt und 5 min im Ultraschallbad behandelt. Danach wurden davon 10 mL entnommen, auf 50 mL aufgefüllt und durch 0,2 µm filtriert, bevor die Proben gemäß Kap. 3.2.7.1 auf Sulfadimidin gemessen wurden.

Neben dieser Vorbereitung für die ELISA-Messung, bei der gem. Kap. 4.1.4.3 die Matrix nicht störte, bzw. bei der sie soweit herunter verdünnt wird, dass der Test nicht gestört wird, wurden die Proben auch für eine HPLC-Messung vorbereitet:

HPLC-Messung von Gülle- und Bodenextrakten

Von den Gülleproben aus Januar 2003 wurde die flüssige Phase per SPE auf Strata X angereichert, indem die Proben entweder direkt (10 mL) aufgegeben wurden, oder bei festerer Konsistenz 10 mL der Gülle mit Wasser versetzt wurden und diese Verdünnung nach Filtration komplett auf die 200 mg-Säulen (gewaschen mit 2 x 2 mL Methanol, konditioniert mit 3 x 2 mL Wasser) aufgegeben wurde. Anschließend wurden die Probengefäße mit 2 x 10 mL Wasser nachgewaschen und auch dieses Wasser auf die Säulen aufgegeben. Nach Trocknung unter Stickstoff-Begasung und Elution mit 5 mL Methanol wurden die Extrakte eingengt und zur Messung in 0,5 mL Methanol aufgenommen.

Von den Bodenproben wurden 10 g in Extraktionszellen gefüllt, mit Isolute aufgefüllt und 3 x 10' bei 100 °C mit Methanol:Wasser (80:20) per ASE extrahiert. Der Methanol-Anteil wurde abgedampft und der Rest mit Wasser auf etwa 10 mL aufgefüllt. Die gesamte Lösung wurde auf die Strata X Säulen gegeben, sowie weitere 2 x 10 mL Wasser, mit denen die Reagenzgläser nachgewaschen wurden. Nach Trocknung, Elution und Einengung wurden die Reste zur Messung in 0,1 mL Methanol aufgenommen.

Die HPLC-Messung auf Sulfonamide, Tetracycline, Fluorochinolone und Penicilline erfolgte wie in Kap. 3.2.2 beschrieben. Zur Quantifizierung wurde von den gemessenen Proben, in denen anhand von Retentionszeitvergleichen ein Antibiotikum vermutet werden konnte, ein Aliquot genommen, mit Standardlösung versetzt und wieder gemessen. Aus dem Vergleich konnte die Konzentration abgeschätzt werden.

3.2.10.4 Betrieb 4

Die Gülle- und die Bodenprobe aus Januar 2003 von Betrieb 4 (Erftkreis) wurden in gleicher Weise vorbereitet und per ELISA auf Sulfadimidin untersucht, wie die Proben von Betrieb 3 aus Januar 2003 (siehe Kap. 3.2.10.3).

Die Vorbereitung und Messung per HPLC-UV geschah ebenfalls analog zu den Proben von Betrieb 3 aus Januar 2003.

3.2.11 Untersuchung von Abwasserproben

3.2.11.1 Kläranlage 1 - Troisdorf

Messungen per ELISA auf SMX

Die Zulaufprobe von Kläranlage 1 (Troisdorf) wurde filtriert: zunächst durch einen Faltenfilter, dann durch 0,45 µm. Anschließend wurde die Probe verschiedentlich verdünnt und mit Standardlösung dotiert (siehe Tab. 19).

Table 19: *Verdünnungen und Dotierungen der Kläranlagenzulaufproben zur Bestimmung des Matrixeinflusses im ELISA-Test auf SMX*

Verdünnungsstufe	Dotierung von SMX [ng]	Konzentration der Dotierung, auf Gesamtlösung bezogen [ng/L]
Unverdünnt	0, 1, 3, 5, 7, 9	0, 99,9, 299, 497,5, 695, 892
10 fach	0, 1, 3, 5, 7, 9	0, 100, 300, 500, 700, 900
50 fach	0, 1, 3, 5, 7, 9	0, 100, 300, 500, 700, 900
100 fach	0, 1, 3, 5, 7, 9	0, 100, 300, 500, 700, 900

Die so hergestellten Lösungen wurden per ELISA auf das Humanantibiotikum Sulfamethoxazol gemessen (Testdurchführung siehe Kap. 3.2.7.1).

3.2.11.2 Kläranlage 2 - Troisdorf-Altenrath

Messungen per HPLC-MS/MS

Eine Zulaufprobe, eine Ablaufprobe innerhalb der Anlage, sowie eine Ablaufprobe an der Ablaufstelle zum Vorfluter wurden untersucht. Die Einzelproben wurden gemäß der Beschreibung in Kap. 3.2.4.1 Methode 2 vorbereitet und angereichert. Die Messung auf die neun in der Methode erwähnten Antibiotika erfolgte per HPLC-MS/MS gemäß Kap. 3.2.4.2., die Korrektur mithilfe der Wiederfindungsraten gemäß Kap. 4.1.3.3.

3.2.12 Untersuchung von Oberflächenwasserproben

3.2.12.1 Proben zum Substanzscreening

Zum Substanzscreening wurden die Proben aus November 2001, Dezember 2001, Januar 2002 und April 2002 (siehe Kap. 3.1.5.4) von Skutlarek et al. nach Kap. 3.2.4.1, Methode 1 aufbereitet und die Extrakte per HPLC-MS/MS gem. Kap. 3.2.4.2 auf 29 verschiedene Antibiotika gemessen. Es wurden keine Mehrfachbestimmungen durchgeführt, sondern nur Einzelproben vermessen (siehe dazu Kap. 3.2.4.3 in Verbindung mit Kap. 4.1.3.4). Zur Ergebniskorrektur wurden die Wiederfindungsraten einer 100 ng/L Stufe verwendet (dargestellt in Christian et al. [158]).

3.2.12.2 Proben zum Gewässerscreening und zu zeitlichen Untersuchungen

Zum Gewässerscreening, zur tageszeitlichen Untersuchung und zur Untersuchung von Monatszeitreihen wurden die Proben aus Dezember 2002, Januar, März, April, Mai, Juli, September und November 2003, sowie die Proben aus Januar 2004 (siehe Kap. 3.1.5.4) aufgearbeitet und gemessen. Dabei handelte es sich um 16 Fließgewässer aus dem Großraum Köln-Bonn, die achtmal beprobt wurden, um vier Proben aus dem Sauerland, zwei aus der Region Niederrhein und um die dreimalige Untersuchung des stehenden Gewässers (Rotter See). Es wurden keine Mehrfachbestimmungen durchgeführt, sondern nur Einzelproben vermessen (siehe dazu Kap. 3.2.4.3 in Verbindung mit Kap. 4.1.3.4).

Die Proben wurden gemäß Kap. 3.2.4.1, Methode 2 selbst aufbereitet und die Extrakte per HPLC-MS/MS gem. Kap. 3.2.4.2 am Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit von D. Skutlarek auf neun verschiedene Antibiotika (siehe Kap. 3.2.4.1 und Kap. 4.2.3.2) gemessen. Die Ergebnisse wurden mit der Wiederfindungsrate der Methode gem. Kap. 4.1.3.3 verrechnet.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Ergebnisse der Methodenentwicklungen

4.1.1. HPLC-UV Verfahren

In Kapitel 3.2.2 wurden HPLC-UV Verfahren zur Messung von Gülle- und Bodenextrakten beschrieben. Damit waren isokratische Trennungen aller angegebenen zwölf Antibiotika möglich.

Sulfonamide

Eine Trennung der drei Sulfonamide gelingt innerhalb von 8 min.

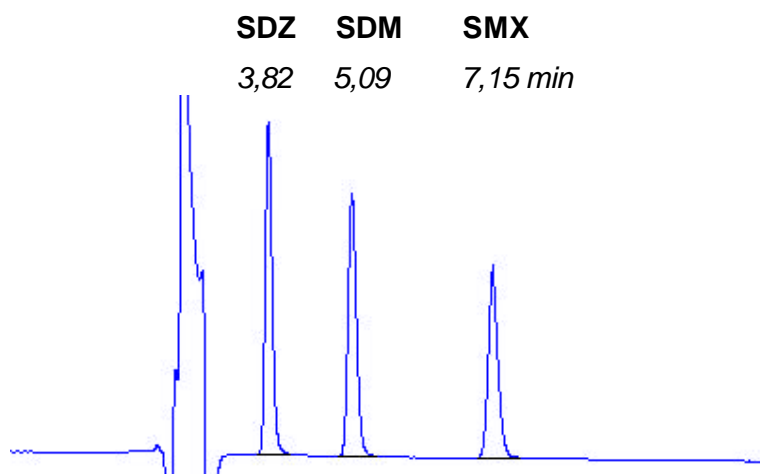


Abbildung 10: *Chromatogramm von drei Sulfonamiden nach HPLC Trennung und UV-Messung bei 265 nm*

Penicilline

Die Messung der Penicilline war zunächst problematisch. Frisch in Methanol angesetzte Standards zeigten einen einzelnen Peak. Innerhalb von einer halben Stunde bei Raumtemperatur zeigte die Messung der gleichen Standardlösung zwei Peaks je Antibiotikum. Mit Zunahme der Standzeit der Lösungen wurden die „neuen Peaks“ größer, die „alten“ kleiner, so dass nach wenigen Tagen von Penicillin V der Ursprungspeak nicht

mehr zu quantifizieren war⁴⁵ (Stammlösungen in Methanol, die bei 4 °C gelagert wurden, waren wenige Tage stabil; daraus hergestellte Verdünnungen in Methanol veränderten sich aber bei RT innerhalb von Stunden). In Wasser angesetzte Standards zeigten auch nach einer Standzeit von Tagen nur einen Substanzpeak (zur Stabilität siehe auch [15, 51, 123]).

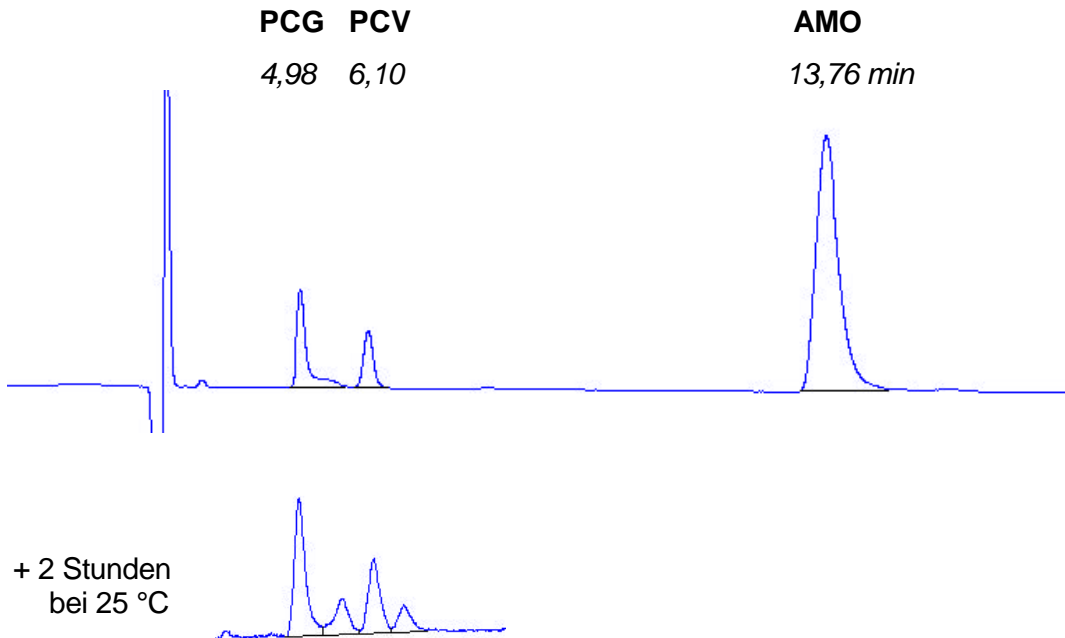


Abbildung 11: *Chromatogramm von drei Penicillinen nach HPLC Trennung und UV-Messung bei 230 nm, Entstehung der Methylester von PCG und PCV nach Lagerung in Methanol*

Tetracycline und Fluorochinolone

Tetracycline und Fluorochinolone sind in ihrem Elutionsverhalten sehr ähnlich. Zudem absorbieren beide Gruppen UV-Licht der Wellenlänge 360 nm. Daher wurden sie in einem gemeinsamen HPLC-Lauf gemessen, und nach Elution der Tetracycline die UV-Wellenlänge von 360 nm auf das Maximum der Fluorochinolone von 278 nm geändert.

⁴⁵ Penicilline

Die Lagerung in Methanol ermöglicht die Bildung der Penicillin-Methylester nach Öffnung des β -Lactamringes. Nach einigen Tagen wurde aus der Substanz mit geschlossenem Ring fast vollständig die antibiotisch inaktive geöffnete Form gebildet.

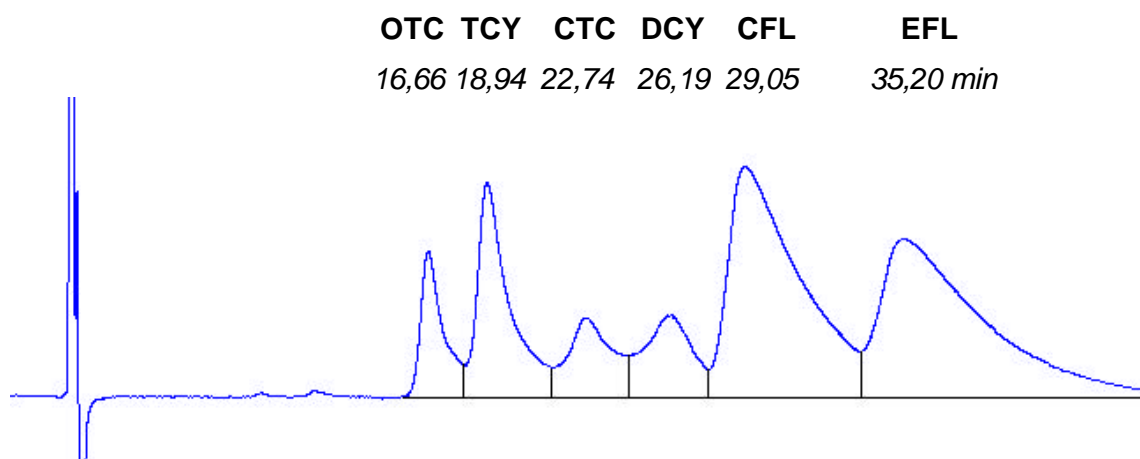


Abbildung 12: *Chromatogramm von drei Tetracyclinen und Fluorochinolonen nach HPLC Trennung und UV-Messung bei 360 nm bzw. 278 nm*

Nachweis- und Bestimmungsgrenze der HPLC-UV Verfahren

Es wurde zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen das Verfahren angewandt, das von der Höhe der Signal/Rausch-Verhältnisse (S/N) von 3 : 1 bzw. von 10 : 1 ausgeht. Um ein ausreichendes Signal (S/N = 3) zu erhalten, waren von den Penicillinen, Tetracyclinen und Fluoroquinolonem ca. 5 ng an absoluter Menge erforderlich, bei den Sulfonamiden ca. 0,15 ng. Zur quantitativen Bestimmung (S/N = 10) waren dies etwa 15 bzw. 0,5 ng. Wurden 10 µL injiziert, so mussten die Lösungen also 1,5 mg/L bzw. 0,05 mg/L mindestens enthalten. Allerdings bezogen sich diese Konzentrationen nur auf Standardlösungen, bzw. sehr saubere wässrige Extrakte. Wurden Bodenextrakte oder Gülleverdünnungen analysiert, so konnte es durch die hohen Matrixanteile, koeluiierende Stoffe und erhöhtes Grundrauschen zu einer starken Beeinträchtigung der Messung kommen, durch die auch die Bestimmungsgrenzen in andere Bereiche verschoben wurden. Zur Messung von matrixbelasteten Proben sollten daher Extrakte hergestellt werden, die relativ sauber sind.

4.1.2 SPE-Materialauswahl und Anreicherungsbedingungen

Für die Anreicherung von Antibiotika aus wässrigen Phasen bzw. aus Extrakten wurden SPE-Verfahren entwickelt (siehe Kap. 3.2.3). Dazu wurden die einzelnen Verfahrensschritte optimiert, so dass aus diesen Ergebnissen dann entsprechende Methoden zur Bestimmung von Antibiotika aus Wasserproben bzw. aus Extrakten abgeleitet werden konnten.

4.1.2.1 Materialauswahl

Die neueren Materialien auf Polymerbasis zeigten deutliche Vorteile gegenüber den RP18-Phasen. Tetracycline waren nicht an den unpolaren Phasen (bzw. nur unbefriedigend) anzureichern, jedoch auf den neuen Phasen. Auch die Sulfonamide zeigten auf LiChrolut EN und IsoluteTM ENV+ bessere Ergebnisse. Daher wurde zunächst die Polymerphase LiChrolut EN zur Anreicherung von Antibiotika aus wässriger Matrix verwendet, da sie zum einen geeignet war, Antibiotika aus verschiedenen Substanzklassen anzureichern und zum anderen preisgünstig und einfach verfügbar war.

Der Versuch, die Festphasenextraktion durch die Verwendung von Ionenaustauschern als Säulenmaterial zu optimieren ergab keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Unter Verwendung des Kationenaustauschers waren nach Ansäuern der Proben lediglich die Sulfonamide anzureichern, nicht aber Penicilline, Fluorochinolone oder Tetracycline.

Im Vergleich der Polymerphasen eigneten sich am besten die SPE-Phasen Strata X und ENVI-Chrom P, die nahezu gleiche Wiederfindungen ergaben. Kaum schlechter war Strata SDBL. LiChrolut EN und Chromabond EASY zeigten 10-20 % geringere Wiederfindungen. Im näheren Vergleich zwischen LiChrolut EN und Strata X, brachte letzteres sogar bei Verwendung von nur 60 mg, im Gegensatz zu 200 mg, bessere Ergebnisse.

Auch im nicht-konditionierten Zustand lieferte Strata X die höchsten Ergebnisse; von der Höhe der Wiederfindungsraten ähnlich hoch wie im konditionierten Zustand. Im Gegensatz dazu zeigten Strata SDBL und ENVI-Chrom P, nicht-konditioniert, kaum Anreicherung. Ebenfalls war bei LiChrolut EN und bei Chromabond EASY ein Einfluss der Konditionierung zu erkennen, der aber relativ gering ausfiel.

Insgesamt erwies sich Strata X als das Material, welches zur Anreicherung der hier untersuchten Antibiotika am besten geeignet war.

4.1.2.2 Vorbereitung der Proben

Eine Ansäuerung der Proben vor der Anreicherung bewirkte, dass die HPLC-UV Messung negativ beeinflusst wurde. Grund dafür ist u.a., dass Huminsäuren in neutralen Proben üblicherweise als Anionen vorliegen, daher kaum an die Festphase adsorbieren und somit die SPE-Säulen einfach passieren. Im Sauren liegen Huminsäuren jedoch in der protonierten Form vor und lassen sich als neutral geladene Moleküle sehr wohl anreichern. In der Messung

bewirkten sie durch ihre frühe Elution und ihre hohe UV-Aktivität, dass die Basislinie erst recht spät konstant wurde [179] und es zu Schwierigkeiten bei der Bestimmung früh eluierender Analyten kam. Die LC-MS/MS Messung wurde nicht negativ beeinflusst.

Auf die Antibiotikaklassen bezogen, ließ sich durch Säurezugabe eine deutliche Verbesserung der Tetracyclin- und Fluorochinolon-Anreicherung erreichen, ohne Verschlechterung bei den Penicillinen. Die Sulfonamide wiesen geringfügig bessere Wiederfindungsraten auf, wenn die Proben neutral angereichert wurden.

Die Ansäuerung auf pH 3 mit konzentrierter Essigsäure oder alternativ mit 50 %iger Schwefelsäure zeigte bei allen Antibiotikaklassen sehr ähnliche Ergebnisse mit tendenziell höheren Werten bei Verwendung der organischen Säure.

Wurden 800 mL Proben mit 2-3 mL konzentrierter Essigsäure versetzt, statt mit 1 mL, so zeigten die Extrakte bei dem niedrigeren pH-Wert von 3-4 etwas bessere Resultate, besonders bei Sulfonamiden, Tylosin und Erythromycin.

Die Zugabe des Komplexbildners Na_2EDTA führte zu keiner Verbesserung der Anreicherung bei den Sulfonamiden, Tetracyclinen, Fluorochinolonen oder Penicillinen, was auf die zu geringe Menge (0,5 mg/100 mL Probe) zurückgeführt werden kann. Dahingegen führte der deutlich höhere Anteil von 200 mg K_2EDTA in 800 mL Probe zu höheren Wiederfindungsraten bei den Fluorochinolonen. Clindamycin ließ sich erst durch die Zugabe dieses Komplexmierungsmittels in den Extrakten nachweisen. Wenn auch nur bei geringen Wiederfindungsraten, so war doch eine Anreicherung wenigstens möglich.

4.1.2.3 Lösungsmittelauswahl

Bei der Elution der adsorbierten Stoffe von der Festphase eigneten sich reines Acetonitril und reines Ethylacetat nicht. Die besten Ergebnisse lieferte die Elution mit reinem Methanol. Die kombinierte Verwendung von Methanol mit anschließender Gabe von Acetonitril oder Ethylacetat brachte keine weitere Verbesserung.

Die Aufnahme der eingengten Eluate in Ammoniumacetatpuffer wirkte sich besonders auf die HPLC-UV Messung der Tetracycline aus. Bei ihnen kam es zu einer Störung der Basislinie. Dies war bei der Aufnahme in Methanol nicht der Fall. Die anderen Stoffklassen wurden durch den Puffer nicht beeinflusst.

Wurden die Rückstände in Wasser : Acetonitril (90 : 10) aufgenommen, so war keine Verschlechterung im Vergleich zu methanolischen Extrakten zu sehen. Die wässrigen Lösungen mit geringem organischen Anteil werden bei der LC-MS/MS Bestimmung wegen geringerer Beeinflussung bei der Ionisierung sogar bevorzugt.

4.1.3 Methoden zur Bestimmung von Antibiotika in Wasserproben (Methode 2)

In Kap. 3.2.4 wurde die Vorbereitung, Anreicherung und Messung von Antibiotika aus Wasserproben beschrieben. Mit den entwickelten Verfahren sollte das Ziel erreicht werden, Antibiotikakonzentrationen in Oberflächen- oder im Abwasser bestimmen zu können, die im unteren ng/L-Bereich liegen. Um eine Aussage über die Güte der Methode zu erhalten, wurden verschiedene methodische Parameter betrachtet.

4.1.3.1 Matrixeinfluss

Ein großes Problem bei der Analytik von Umweltproben stellt die Matrix dar. Sie kann vor allem Schwierigkeiten bei der massenspektrometrischen Bestimmung durch das Phänomen der Ionensuppression bereiten [180, 181]. Die Ionensuppression führt dazu, dass weniger Ionen detektiert werden, als eigentlich in der Probe aus den Substanzen erzeugt werden könnten. In Standards, die keine Matrix aufweisen, tritt sie nicht auf, wohl aber in echten Proben. Daher sind die gemessenen Gehalte meist Mindestgehalte. Im Gegensatz zur Ionensuppression kann auch eine Ionisationsunterstützung erfolgen, durch die Überbestimmungen resultieren können.

Im Falle der Antibiotikadetektion tauchte eine Überbestimmung durch Ionisationsunterstützung allerdings nie auf, wie anhand von Dotierungsproben erkannt werden konnte:

Die Messung der beiden dotierten Oberflächenwasserextrakte (siehe Kap. 3.2.4.3) zeigte, dass eine gewisse Ionensuppression bei der Messung erfolgt. Dadurch waren die gefundenen Konzentrationen etwas geringer als die Dotierungen. Die Suppression wirkte sich aber bei der Wupper-Probe mit höherer Matrixbelastung (schon sichtbar an der Trübung des Wassers) nicht stärker aus, als bei den unbelasteten Proben. Somit erfolgten hierbei auch keine größeren Unterbestimmungen, als bei den anderen Extrakten. Die Werte der Ionenunterdrückung lagen in den verschiedenen Extrakten bei jeweils 0 % für Clindamycin,

7-8 % Sulfadimidin, 6-13 % Ciprofloxacin, 2-20 % Penicillin G, 12-27 % Sulfamethoxazol, 20-24 % Tylosin, 23-31 % Enrofloxacin, 39-44 % Erythromycin und 45-52 % für Trimethoprim, wobei bei manchen Substanzen der Wupperextrakt stärkere Unterdrückungen zeigte, bei anderen aber der Mischextrakt. Die Unterschiede in den Unterdrückungen fielen aber nicht besonders groß aus, am stärksten noch bei Penicillin G, bei dem die weniger belastete Probe eine um 18 % stärkere Unterdrückung zeigte, als der Wupperextrakt.

In den Ergebnissen der Probenmessungen spielen die Unterdrückungen keine große Rolle, da sie sich auch in den Probenextrakten zur Bestimmung der Wiederfindungsraten auswirkten. Das dafür verwendete Leitungswasser ist ähnlich einer unbelasteten Probe und zeigte mit der enthaltenen Matrix (aus den Probenaufarbeitungsschritten) ähnliche Einzelunterdrückungen, wie in diesen Sonderproben. Da die Unterdrückung und Detektionsfähigkeit sich auf die Wiederfindungsraten auswirkt, bedürfen die Proben zusätzlich zur Einbeziehung der WDF keinen weiteren Berechnungen.

Auch anhand der Signal-Rausch Verhältnisse erkennt man, dass sich unbelastete und belastete Probe kaum unterschieden (siehe Tab. 20).

Tabelle 20: *Signal/Rausch-Verhältnisse bei Konzentrationen der Antibiotika von je 10 µg/L in dotierten unbelasteten Misch-Extrakten und in dotierten belasteten Wupper-Mischproben; errechnete Konzentrationen von Antibiotika in der Messlösung [µg/L], die S/N-Verhältnisse von 10:1 bzw. 3:1 ergeben; als Mittelwert von drei Dotierungsstufen*

	CFL	CLI	EFL	ERY	PCV	SDM	SMX	TRI	TYL
<hr/>									
10 µg/L	Signal/Rausch-Verhältnis								
Wupper	91	840	291	1923	103	181	98	130	546
Unbelastet	118	877	267	2857	221	116	156	602	2222
<hr/>									
S/N = 10:1	Konzentrationen [µg/L]								
Wupper	1,100	0,119	0,344	0,052	0,974	0,552	1,021	0,769	0,183
Unbelastet	0,846	0,114	0,375	0,035	0,452	0,862	0,640	0,166	0,045
<hr/>									

	CFL	CLI	EFL	ERY	PCV	SDM	SMX	TRI	TYL
S/N = 3:1	Konzentrationen [$\mu\text{g/L}$]								
Wupper	0,330	0,036	0,103	0,016	0,292	0,166	0,306	0,231	0,055
Unbelastet	0,254	0,034	0,113	0,011	0,136	0,259	0,192	0,050	0,014

Die Vermutung hier war gewesen, dass durch mitextrahierte und angereicherte Matrix auch das Rauschen der Probe gravierender wäre und deshalb die Integration der Signalpeaks schwieriger würde. Einzig bei Trimethoprim und Tylosin waren die Signal/Rausch-Verhältnisse des Wupper-Extraktes deutlich anders als die Signal/Rausch-Verhältnisse des unbelasteten Extraktes bei gleicher Konzentration. Dies führte aber dennoch nicht zu Unterbestimmungen, sondern ergab sehr ähnliche Messergebnisse beider Extrakte, was daran liegen mag, dass die Signal/Rausch-Verhältnisse auch bei den Wupper-Proben noch sehr hoch liegen. So wurden bei TRI und TYL auch bei Konzentrationen von nur $30 \mu\text{g/L}$ in den Messlösungen Verhältnisse noch von 400:1 bzw. 1600:1 erhalten. Ansonsten waren die S/N⁴⁶ Verhältnisse der verschiedenen Gewässer aber sehr ähnlich

Auch die *relativen* S/N-Verhältnisse (nicht abgebildet) sind sehr ähnlich, also die Verhältnisse, die sich bei verschiedenen Konzentrationsstufen (0, 30, 50 ppb) ergeben, die aber auf eine gleiche Basis-Konzentration umgerechnet werden. Sie unterscheiden sich weniger stark voneinander, als es die zwischen verschiedenen Extrakten tun. Das bedeutet: Grundsätzlich erhöht sich auch das S/N-Verhältnis mit steigenden Gehalten; hohe Analyt-Gehalte wirken sich bei den unterschiedlichen Gewässer-Extrakten aber nicht anders auf das Verhältnis aus, als niedrige.

Die Erzeugung und Messung der Ionen im massenspektrometrischen Prozess wird also durch verschiedene Matrixanteile und Probengehalte hier nicht bedeutend gestört und auch die Integration der Peaks macht keine Schwierigkeiten, so dass eine Messung und Auswertung sowohl von matrixbelasteten, als auch von unbelasteten Proben in der gleichen Weise, mit der gleichen Anreicherungs- und Bestimmungsmethode, und bei etwa gleichstarker Suppression, möglich ist. Die Matrix im Leitungswasser zur Bestimmung der Wiederfindungsraten führte zu ähnlichen Ionenunterdrückungen wie bei Oberflächenwasserproben. Daher ist die Bestimmung der Wiederfindungsraten, sowie der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, mit

⁴⁶ S/N

signal to noise ratio = Signal/Rausch-Verhältnis

einem solchen Wasser legitim. Die erhaltenen Wiederfindungsraten können auf die verschiedenen Gewässer angewandt werden; es sind keine gesonderten Bedingungen für unterschiedlich stark belastete Oberflächengewässer nötig.

Quantifizierung

Zusätzlich zur Identifizierung eines eventuellen Einflusses der Matrix (wie gesehen, ohne große Bedeutung) konnte durch die Dotierung auf verschiedenen Konzentrationsstufen gefunden werden, dass eine Quantifizierung mittels Standardadditionsverfahren zu ebensolchen Ergebnissen führte, wie die Quantifizierung anhand einer externen Kalibriergeraden. Es trat nicht auf, dass Nebenbestandteile den Analyten vortäuschten oder die Bestimmung erschwerten, was die Anwendung des Standardadditionsverfahrens mit mehrfacher Dotierung, Aufarbeitung und Messung einer einzelnen Probe erforderlich gemacht hätte. Es konnte also die externe Kalibration angewandt werden und jede Probe brauchte nur einzeln aufgearbeitet werden.

Die Vermessung der Standards zur Quantifizierung war aber aufgrund der Tagesform der Gerätes (MS) an jedem Messtag erneut erforderlich.

4.1.3.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Dotierungsproben zur Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden in Laborleitungswasser angesetzt. Zunächst war versucht worden, diese Methodenparameter anhand eines scheinbar unbelasteten Baches zu bestimmen. Vorherige Messungen ergaben, dass in nahezu jedem Oberflächengewässer, aber nicht in allen, Antibiotikarückstände zu finden sind. Höchstens in ganz kleinen Gewässern, oder aber im oberen Ursprungsbereich eines Baches oder Flusses, in dem gewährleistet ist, dass keine humane Beeinflussung erfolgt, wären rückstandsfreie Proben zu erhalten. In diesen früheren Messungen waren in dem besagten Bach keine Gehalte zu finden, weshalb Wasser davon verwendet wurde, um es zu dotieren. Allerdings waren in dem Bachwasser zu diesem Zeitpunkt dann doch Rückstände enthalten.

Daher wurde als Matrix Laborleitungswasser genommen, da dies keine nachweisbaren Rückstände enthielt. Außerdem ergaben die Messungen zum Einfluss der Matrix, dass die Ionenunterdrückung in Leitungswasser ähnlich wie in Gewässerproben war. Da auch zwischen unterschiedlich stark belasteten Gewässern kein großer Einfluss der Matrix festzustellen war, lassen sich vom Leitungswasser abgeleitete Messparameter auf

Oberflächengewässer Nordrhein-Westfalens anwenden, so verschieden die Gewässer auch sind. Eine besondere Behandlung mancher Proben ist nicht erforderlich.

Ein Unterschied, der zu Schwierigkeiten oder Schwankungen in der Bestimmung führen könnte, ist der Schwebstoffanteil. Dieser variiert nicht nur zwischen den Gewässern, sondern auch innerhalb eines Gewässers im zeitlichen Verlauf. Um die Proben, genauer die Wasserphasen, miteinander vergleichen zu können, wurde dieser Unterschied aber schon während der Behandlung ausgeglichen, indem Feststoffe durch Filtration durch $0,45\ \mu\text{m}$ abgetrennt wurden.

Wollte man jede Unterschiedlichkeit der Gewässer und auch eines jeden einzelnen Gewässers mit der Zeit berücksichtigen, so wären zu jeder Probe und jedem Zeitpunkt einzeln die Wiederfindungsraten zu bestimmen. Dies scheint aber aufgrund der Ergebnisse von Kap. 4.1.3.1 nicht erforderlich zu sein.

a) DIN 32645

Zur Auswertung nach diesem Verfahren werden die Istwerte der Proben gegen die Sollwerte aufgetragen (siehe Abb. 13).

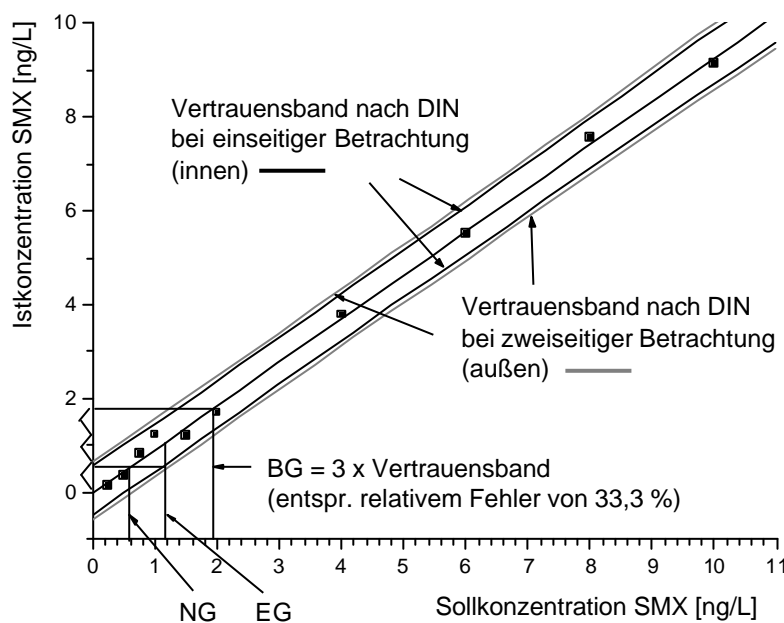


Abbildung 13: Darstellung der Bestimmung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach dem Verfahren der DIN 32645

Die Nachweisgrenze (NG) errechnet sich als der kleinste Messwert, der mit einer Sicherheit von 99 % vom Blindwert zu unterscheiden ist. Wird in einer Probe ein *Messwert* im Bereich der NG erhalten, so kann mit der Sicherheit von 99 % davon ausgegangen werden, dass der Analyt in der Probe vorhanden ist. Aufgrund der statistischen Verteilung wird ein Gehalt des Analyten, der der NG entspricht, in 50 % der Fälle größer als die NG gemessen und in 50 % der Fälle kleiner als die NG (β -Fehler = 50%). Um diesen Fehler zu verringern, wird als weitere Grenze die Erfassungsgrenze gesetzt, an der der β -Fehler, gleich dem α -Fehler (also hier = 1 %) ist. Das heißt: Eine *Konzentration* im Bereich der Erfassungsgrenze kann Messwerte liefern, die mit einer Sicherheit von 99 % vom Blindwert unterschieden werden können (dies ist bei der NG nicht der Fall). Die Erfassungsgrenze entspricht dem 2fachen der NG. Messwerte, die dem oberen Wert des Vertrauensbandes bei der Konzentration der EG entsprechen, können als sicher erfasst bezeichnet werden. Extrapoliert man diesen Messwert (verrechnet mit dem relativen Fehler, der hier als 33,3 % gewählt wurde) auf die Eichgerade, so erhält man die Bestimmungsgrenze (BG) auf der x-Achse (siehe Abb. 13).

Es wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die neun in Methode 2 Kap. 3.2.4.1 genannten Substanzen ermittelt, sowie von weiteren Antibiotika, die aber im Standarduntersuchungsprogramm nicht weiter berücksichtigt wurden (siehe Tab. 21).

Die Werte der NG liegen im einstelligen ng/L Bereich, die der BG im unteren zweistelligen Bereich. Sehr empfindlich nachweisbar sind SMX, TRI und ERY, die sich z.T. sogar im sub-ppt Bereich nachweisen lassen und BG von nur 2 bzw. 5 ng/L haben.

Table 21: *Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von Antibiotika in dotiertem Laborleitungswasser, nach SPE-Anreicherung [ng/L]*

	Nachweisgrenze [ng/L]	Erfassungsgrenze [ng/L]	Bestimmungsgrenze [ng/L]
Ciprofloxacin	17,0	34,0	55,2
Clindamycin	2,62	5,25	9,56
Enrofloxacin	8,08	16,2	66,4
Erythromycin	1,70	3,41	5,48
Phenoxymethylpenicillin	8,17	16,4	26,3
Sulfadimidin	3,57	7,13	11,9
Sulfamethoxazol	0,590	1,18	1,97
Trimethoprim	0,567	1,13	1,90
Tylosin	5,41	10,8	28,2

	Nachweisgrenze [ng/L]	Erfassungsgrenze [ng/L]	Bestimmungsgrenze [ng/L]
Azithromycin	0,761	1,52	2,51
Clarithromycin	1,38	2,76	4,50
Cloxacillin	6,55	13,1	44,3
Flucloxacillin	8,33	16,7	77,4
Ofloxacin	3,34	6,68	12,0
Oxacillin	11,1	22,2	147
Roxithromycin	1,09	2,19	3,36
Spiramycin	3,25	6,50	10,8

b) Bestimmung der NG/BG über Signal/Rausch-Verhältnisse

Dieses Verfahren beruht allein auf der Messbarkeit von Substanzen, also dem chromatographischen Trennvorgang mit Detektion, und geht nicht von dem gesamten analytischen Verfahren mit Aufreinigung und Konzentrierung aus.

Beim Verfahren nach der DIN 32645 wirkt sich die Probenaufarbeitung direkt auf die Gehalte in den Proben aus, und damit in der Streuung der Proben und in den Vertrauensbändern.

Im Verfahren der S/N-Verhältnisse hat die Probenaufarbeitung keine derartige Auswirkung, da nicht die Dotierung auf zehn verschiedene Konzentrationen geschieht. Es braucht nur die Konzentration des Analyten in einem Extrakt⁴⁷ bestimmt und die Signalhöhe mit der Höhe des Grundrauschens verglichen zu werden. Die NG und BG werden davon ausgehend berechnet. Je höher das Grundrauschen ist, bzw. je niedriger das Signal dabei ist, desto höher werden auch NG und BG. Die Probenaufarbeitung wirkt sich daher doch in gewisser Weise auf die NG und BG aus, da durch die Aufkonzentrierung auch die Matrix mit angereichert wird und daher das Rauschen höher ist, als beispielsweise in einem Standard.

In Tab. 20 sind die NG und BG aufgelistet, die als Konzentration im Extrakt berechnet sind. Das heißt, dass in einem so hergestellten Extrakt die Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen nachweisbar und bestimmbar sind. Berücksichtigt man die Anreicherung um den Faktor 1000, so lassen sich aus Proben Gehalte bestimmen, die ein Tausendstel der Tabellenwerte betragen und somit im ng/L-Bereich liegen. Die nach diesem Verfahren ermittelten Nachweisgrenzen liegen zwischen 0,02 und 0,33 ng/L, die Bestimmungsgrenzen zwischen 0,05 und 1,1 ng/L und somit meist in einem deutlich niedrigeren Bereich, als die nach DIN 32645 [160] bestimmten analytischen Grenzwerte.

⁴⁷

möglichst aber in Mehrfachbestimmung

4.1.3.3 Wiederfindungsraten

Allgemeines zu Wiederfindungsraten

Es existieren verschiedene Verfahren um die Wiederfindungsraten zu bestimmen. Ein gängiges ist die Berechnung der einzelnen Wiederfindungsraten (WDF) auf jeder der Konzentrationsstufen (siehe z.B. Schlüsener et al. [137]). Dadurch hätte man in dem Fall hier fünf einzelne Raten, aus denen man eine mittlere WDF bestimmen könnte. Das Problem dabei ist, dass jede einzelne Konzentrationsstufe gleich stark gewichtet ist und somit mit dem gleichen Anteil in die mittlere WDF eingeht. In der Analytik von Stoffen im ppt-Bereich kommt es allerdings häufig vor, dass besonders sehr niedrige Konzentrationen stark überbestimmte Werte ergeben. Dadurch kann es sein, dass hier Einzelwiederfindungen von 140 % und mehr vorkommen. Dieser Wert hätte dann den gleichen Einfluss auf die Gesamt-WDF, wie die anderen Werte, die beispielsweise alle bei 70 % liegen.

Um solche Verzerrungen zu vermeiden, kann das Kalibrierkurvenverfahren angewandt werden. Dabei werden die gefundenen Istkonzentrationen in einem Diagramm gegen die Sollkonzentrationen aufgetragen. Aus der Steigung der Geraden kann dann eine mittlere Wiederfindung abgelesen werden, die durch Abweichungen der kleinen Konzentrationsstufen allerdings weniger stark beeinflusst wird, wie dies bei der Berechnung eines Mittelwertes der Fall ist. Im Idealfall beträgt die Steigung einer solchen Geraden 1, was also einer WDF von 100 % entspricht [182, 183]. Nach diesem Verfahren kann auch eine analythaltige Matrix zur Bestimmung der WDF verwendet werden, da der ursprüngliche Analytgehalt in jeder einzelnen Probe gleich hoch ist und somit zwar einen y-Achsenabschnitt (also einen Sockel) bewirkt, aber nicht in die Steigung eingeht.

In analytfreien Proben hingegen ist ein solcher Basisgehalt nicht vorhanden, wodurch auch ein y-Achsenabschnitt nicht entstehen sollte. Wenn dennoch ein solcher Abschnitt erhalten wird, liegt das an den unterschiedlichen Einzel-WDF der Konzentrationsstufen (wären die Einzel-WDF vollkommen gleich, so träte kein y-Achsenabschnitt auf). Dass ein y-Achsenabschnitt in analytfreien Proben durchaus aber kritische Ergebnisse der WDF liefern kann, soll folgendes Beispiel anzeigen, anhand dessen auch die unterschiedlichen Bestimmungsarten der WDF verdeutlicht werden sollen:

Wie erwähnt, treten in der Spurenanalytik häufig starke Überbestimmungen auf niedrigen Konzentrationsniveaus auf. Es seien als Beispiel Dotierungen analytfreier Proben auf die Konzentrationen 5, 10, 25, 50, 75 und 100 ng/L. Diese Proben sollen nach der Bestimmung folgende Ergebnisse liefern:

Tabelle 22: *Beispiel zur Verdeutlichung der Unterschiede der WDF-Bestimmung*

Dotierung [ng/L]	Probe 1 [ng/L]	Probe 2 [ng/L]	Probe 3 [ng/L]	Mittelwert [ng/L]	mittl. Einzel- WDF [%]
5	8,2	8,5	7,0	7,9	158
10	13,7	12,3	12,0	12,7	127
25	25,8	27,0	26,8	26,5	106
50	49,5	52,5	53,1	51,7	103
75	74,3	73,8	75,9	74,7	100
100	94,1	92,1	96,2	94,1	94
Mittelwert der WDF					115

Als Mittelwert der einzelnen WDF ergibt sich hier also 115 %. Obwohl vier der Konzentrationsstufen Einzel-WDF von unter 107 % ergeben, kommt dieser höhere Wert zustande, eben weil auch die niedrigen Konzentrationsstufen die gleiche Gewichtung in der Berechnung haben, wie die höheren. Versucht man dies auszugleichen, indem man das Kalibrierkurvenverfahren anwendet, so erhält man folgendes Diagramm:

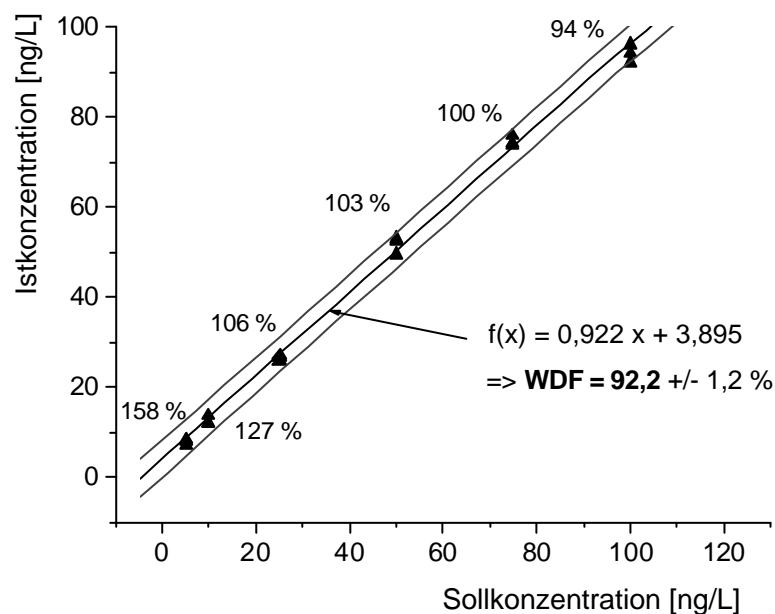


Abbildung 14: *Beispiels-WDF nach dem Kalibrierkurvenverfahren*

Werden die Messwerte gegen die Sollwerte aufgetragen, so erhält man aufgrund der unterschiedlichen WDF auf den einzelnen Konzentrationsstufen, eine Kalibriergerade mit einem gewissen y-Achsenabschnitt. Dadurch, dass nun die niedrigen Stufen deutlich überbestimmt sind, und die höheren eher normale Werte liefern, wird das Problem sichtbar, dass man anhand der Geradensteigung eine WDF von nur 92 % erhält. Problematisch und fraglich ist dies deswegen, da jede einzelne Konzentrationsstufe Werte darüber aufweist. Warum sollte das Verfahren also eine mittlere WDF von 92 % ergeben, wenn doch alle Einzelwerte z.T. deutlich darüber liegen? Hätte man eine analythaltige Probe, so würde das die stärkeren Überbestimmungen bei den niedrigen Stufen erklären und eine niedrigere Gesamtwiederfindung (als Geradensteigung, aufgrund der Geradenanpassung nach Kalibrationsverfahren), gegenüber den höheren Einzelwiederfindungen rechtfertigen. In analytfreien Proben kann ein solches Bild aber ebenfalls auftreten (die Nullproben würden eine Abwesenheit des Analyten belegen). In einem solchen Fall ist es nicht realistisch, dass eine mittlere Kalibrations-WDF vom Wert her unter sämtlichen Einzel-WDF liegen soll.

Um dies zu vermeiden und eine WDF zu erhalten, die den tatsächlichen Verhältnissen eher entspricht, sollte eine Geradenanpassung durch den Ursprung erfolgen (siehe Abb. 15).

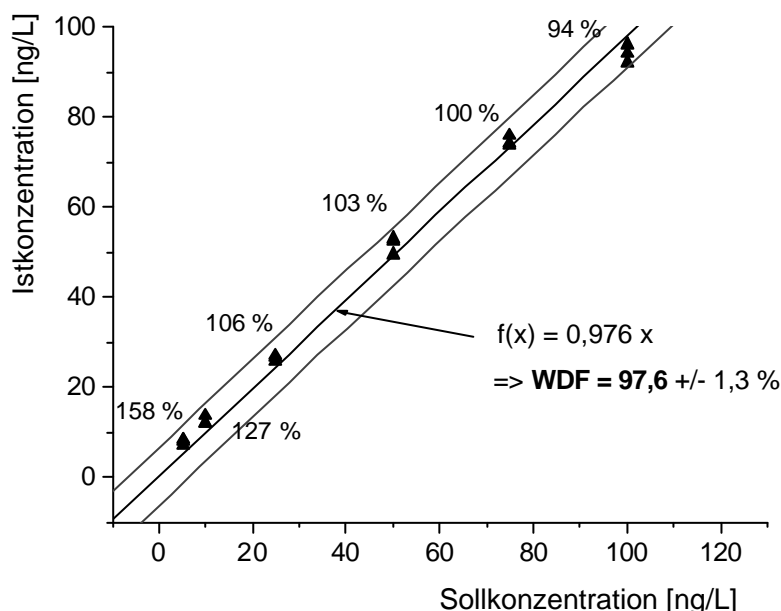


Abbildung 15: *Beispiels-WDF nach dem Kalibrierkurvenverfahren, Anpassung der Gerade durch den Ursprung*

Einerseits wird durch diese Anpassung der Tatsache Rechnung getragen, dass auch in den Nullproben keine Gehalte an Analyt oder an analytvortäuschender Matrix gemessen wurden. Andererseits geschieht eine Nivellierung der einzelnen Wiederfindungen, ohne dass einzelne abweichend hohe Werte zu stark das Ergebnis beeinflussen.

Resultat ist also eine Wiederfindung, die mit etwa 98 % einen realistischeren Wert ergibt als die zu niedrigen 92 % ohne Ursprungsanpassung oder die unverhältnismäßig hohen 115 % als Mittelwert der Einzel-WDF.

Bestimmung der Wiederfindungsraten

Nach dem Kalibrierkurvenverfahren mit Ursprungsanpassung wurden die Wiederfindungsraten des Verfahrens zur Messung von Antibiotika in Oberflächengewässern bestimmt. Dabei wurde anhand von Nullproben festgestellt, dass im verwendeten Laborleitungswasser weder Analytrückstände vorhanden waren, noch Matrixbestandteile einen Analytgehalt vortäuschten. Zur WDF-Bestimmung wurden nur solche Proben herangezogen, deren Konzentrationen über den Bestimmungsgrenzen (gem. Tab. 21) lagen. Anhand des Ausreißer-F-Testes wurden die Proben identifiziert und deren Werte eliminiert, die bei Anpassung der Geraden durch den Ursprung, nicht dem Vertrauensbereich einer Sicherheitsschwelle von 95 % entsprachen. Mit den restlichen Wertepaaren wurde die Kalibration durchgeführt und als Steigung die Wiederfindungsrate bestimmt. Die in Tabelle 23 dargestellten Wiederfindungsraten wurden alle nach diesem Verfahren bestimmt und geben die Wiederfindung über das gesamte Anreicherungs- und Messverfahren wieder.

Tabelle 23: *Wiederfindungsraten sowie deren Fehler (als Fehler der Steigung) von neun Antibiotika in Laborleitungswasser, ermittelt nach dem Kalibrierkurvenverfahren mit Ursprungsanpassung*

Substanz	Wiederfindung
Ciprofloxacin	72,9 ± 2,1 %
Clindamycin ⁴⁸	20,4 ± 3,3 %
Enrofloxacin	71,8 ± 1,3 %

⁴⁸ WDF-CLI

Clindamycin war bei dieser Anreicherung die Ausnahme und ließ sich nur mit etwa 20 % wiederfinden, weshalb Messergebnisse und Aussagen bzgl. CLI in diesem Fokus zu betrachten sind.

Substanz	Wiederfindung
Erythromycin ⁴⁹	115,7 ± 5,7 %
Phenoxymethylpenicillin	58,6 ± 1,1 %
Sulfadimidin	76,3 ± 0,4 %
Sulfamethoxazol	72,7 ± 0,6 %
Trimethoprim	66,8 ± 0,3 %
Tylosin	63,3 ± 1,7 %

Am Beispiel des Sulfamethoxazols sind hier nochmals die unterschiedlichen Wiederfindungsraten je nach Auswerteverfahren dargestellt, von denen Abb. 17 rechts die realistischste WDF darstellt, mit der auch die Proben in den Messkampagnen verrechnet wurden.

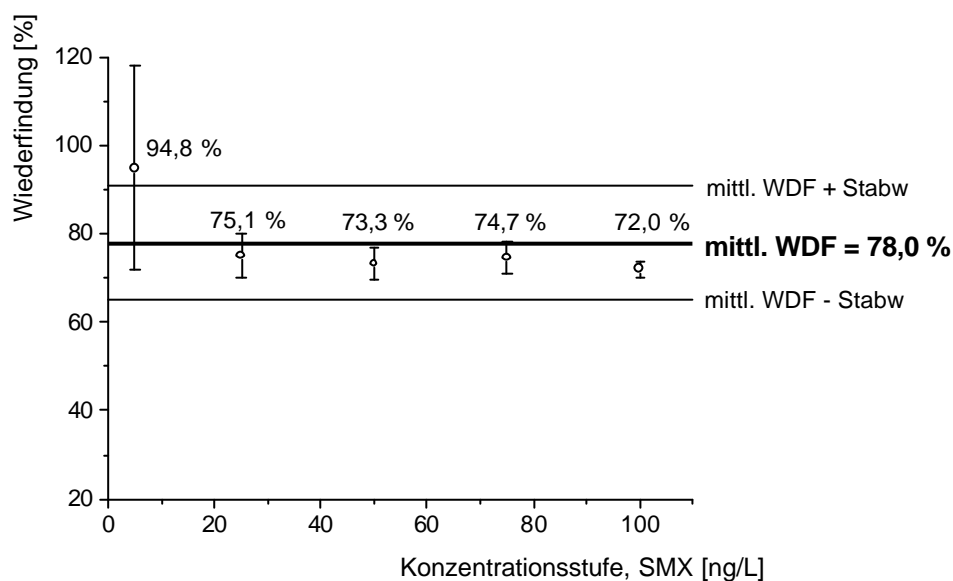


Abbildung 16: Ermittlung der Wiederfindung von SMX anhand der mittleren Wiederfindungsraten auf den einzelnen Konzentrationsstufen bei vollkommen gleicher Gewichtung der einzelnen Stufen

⁴⁹ ERY

bestimmt als Dehydrato-Erythromycin, welches sich während der Aufarbeitung aus Erythromycin bildet

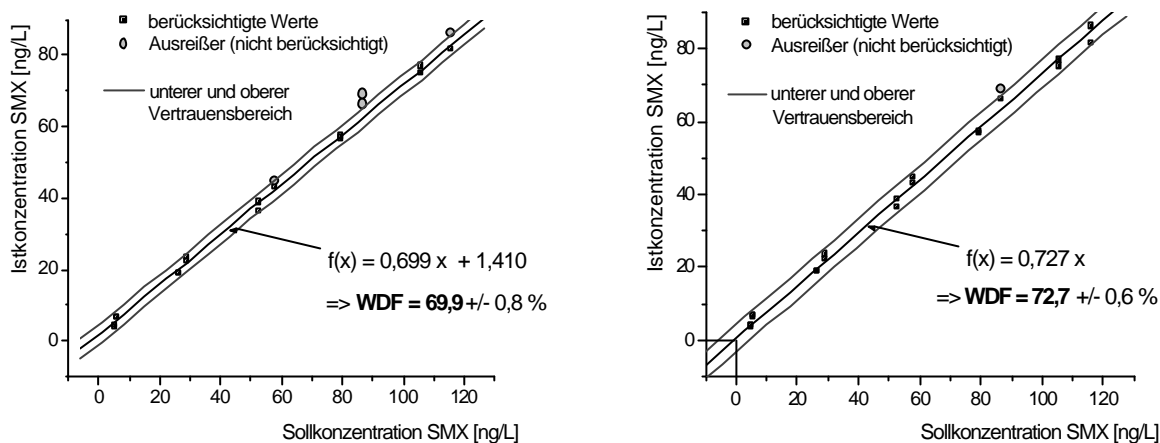


Abbildung 17: Ermittlung der Wiederfindung von SMX anhand des Eichkurvenverfahrens mit y-Achsenabschnitt (links) und mit Zwängung durch den Ursprung (rechts)

Bei den Gesamtwiederfindungsraten (Tab. 23) der neun Substanzen erkennt man, dass die Wiederfindungen recht unterschiedlich sind. Dies liegt zum einen an der Verschiedenartigkeit der Stoffe, die immerhin aus fünf Antibiotikaklassen stammen und somit sich in ihren physikochemischen Eigenschaften stark unterscheiden, wodurch auch die Adsorptions- und Verteilungseigenschaften an der Festphase sehr unterschiedlich sind. Daher ist die Begrenzung auf ein SPE-Material und eine einzige Art der Probenaufarbeitung inklusive Ansäuerung und Komplexierung immer ein Kompromiss. Wollte man die Wiederfindungsraten einzelner Substanzen verbessern, so ist dies zwar ohne Probleme möglich, geht aber zu Lasten anderer Stoffe, die dann schlechtere WDF zeigen würden. Auch wäre die Anwendung von verschiedenen Aufarbeitungsverfahren, je nach Substanzklasse möglich, was aber einen erheblichen Mehraufwand bedeutet, weshalb hier ein einziges Verfahren dazu dient, diese neun Substanzen anzureichern. Zum anderen ist die unterschiedliche Wiederfindung auch darin begründet, dass die Substanzen innerhalb eines einzigen HPLC-Laufes und mit den gleichen MS-Parametern bestimmt werden sollten [121]. Dies hat den Vorteil, dass lediglich ein Trenn- und Messvorgang durchgeführt werden muss, führt aber dazu, dass diese Vorgänge nicht vollkommen optimal auf jede Substanz abgestimmt sind und durch Ionenunterdrückung verminderte WDF erhalten werden. Dadurch kann es sein, dass zwar die reine Anreicherung sehr gute Werte liefert, die um 90-100 % liegen, aber durch das Messverfahren diese Werte auf 60-70 % vermindert werden. Es ist außerdem zu berücksichtigen, dass es bei dem

Verfahren um die Bestimmung von Rückständen im ng/L-Bereich geht, die eine weitere Erschwernis bedeutet.

4.1.3.4 Varianzen

In den vier Proben, die von der Erft gezogen und getrennt aufgearbeitet worden sind, waren von den neun untersuchten Substanzen jeweils vier nachweisbar: Clindamycin, Erythromycin, Sulfamethoxazol und Trimethoprim. Die Gehalte lagen im Bereich von 10-20 ng/L. Dabei wurden trotz der geringen Konzentrationen relative Standardabweichungen von nur 8-17 % erhalten (siehe Tab. 24).

Tabelle 24: *Konzentrationen, Mittelwerte, Standardabweichungen und relative Standardabweichungen von vier Antibiotika in einer anthropogen relativ stark belasteten Oberflächenwasserprobe (Erft), Probenahme und Messung März 2003*

	Clindamycin	Erythromycin	Sulfamethoxazol	Trimethoprim
Erft-Probe a [ng/L]	14,71	12,96	15,13	10,48
Erft-Probe b [ng/L]	14,71	15,56	17,88	13,47
Erft-Probe c [ng/L]	19,61	18,15	17,88	13,47
Erft-Probe d [ng/L]	19,61	12,96	16,51	11,98
Mittelwert [ng/L]	17,16	14,91	16,85	12,35
Stabw. [ng/L]	2,83	2,48	1,32	1,43
rel. Stabw. [%]	16,49	16,67	7,81	11,59

Da die relativen Standardabweichungen in Anbetracht der niedrigen Konzentrationen sehr gering sind und also keine großen Streuungen auftreten, die die Ergebnisunsicherheit erhöhen würden, wurde bei den Probenmessungen auf Mehrfachbestimmungen zugunsten einer erhöhten Gesamtprobenanzahl verzichtet.

Insgesamt stand mit Aufarbeitungsmethode 2 und der LC-MS/MS Messung ein Verfahren zur Verfügung, welches für neun verschiedene Substanzen nur eine einzige Probenvorbereitung und einen einzigen Messvorgang erfordert, und wodurch die Substanzen sogar im unteren ppt-Bereich mit passablen Wiederfindungsraten bestimmt werden können.

4.1.4 Extraktionsversuche (Gülle)

4.1.4.1 Einfluss der Extraktionstemperatur und der Anzahl der Extraktionszyklen

Extraktionstemperatur

Gülleproben, die bei 80, 100 und 120 °C extrahiert worden sind, zeigten etwa die gleichen messbaren Gehalte an Sulfadimidin. Etwa 20 % höhere Ergebnisse waren zu erhalten, wenn die Proben bei 140 °C extrahiert wurden. Nochmals 10-20 % höhere Werte brachten die Extrakte des Versuches bei 160 °C (siehe Abb. 18).

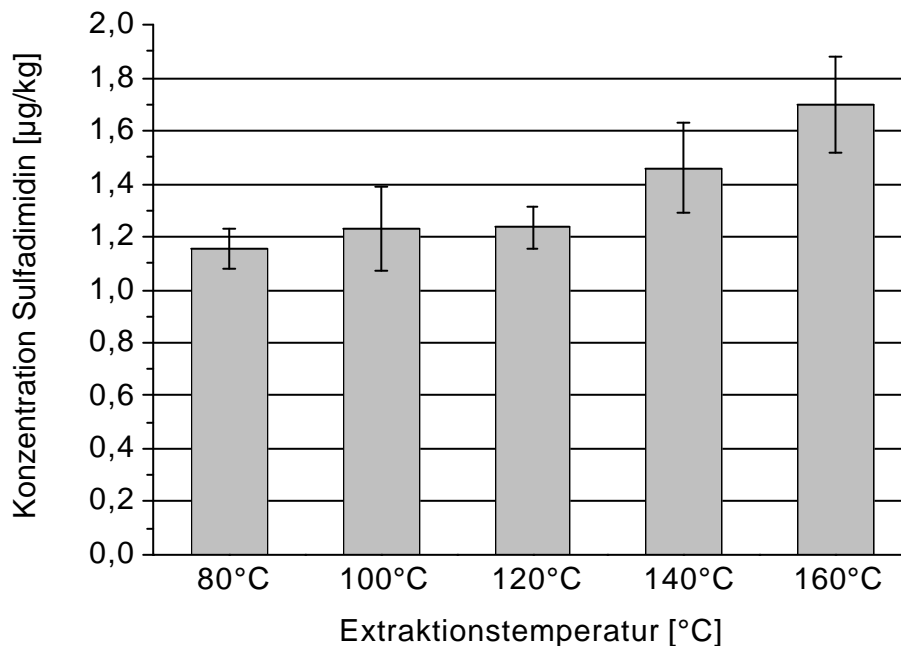


Abbildung 18: *Konzentration an Sulfadimidin in einer Schweinegülle in Abhängigkeit von der Extraktionstemperatur [mg/kg]*

Mittelwert aus vier bzw. fünf Einzelnextraktionen und Bestimmung auf zwei ELISA-Platten mit jeweiliger dreifach-Bestimmung

Ergaben die Extrakte der niedrigeren Temperaturstufen Konzentrationen von 1,15 bis 1,24 mg Sulfadimidin pro kg Gülle (Feuchtgewicht), so lagen die Konzentrationen bei 140 °C und 160 °C bei durchschnittlich 1,46 bzw. 1,70 mg/kg. Auch bei den geringeren Temperaturen war eine gewisse Abhängigkeit von der Temperatur zu erkennen, die jedoch nicht signifikant war (höhere Ausbeuten bei höherer Temperatur, siehe Abb. 18). Abgebildet sind die Mittelwerte aus fünf Extraktionsversuchen (bei 160 °C aus vier), die mit ein bis fünf Extraktionszyklen gewonnen wurden.

Anzahl der Extraktionszyklen

Eine Abhängigkeit der Extraktionsausbeuten von der Anzahl der Zyklen scheint nicht zu existieren. So zeigten die Extrakte, die durch fünf Zyklen erhalten wurden, keine eindeutig höheren Sulfadimidingehalte, als Extrakte, die nur mit einem 10 minütigen Schritt erhalten wurden (siehe Abb. 19).

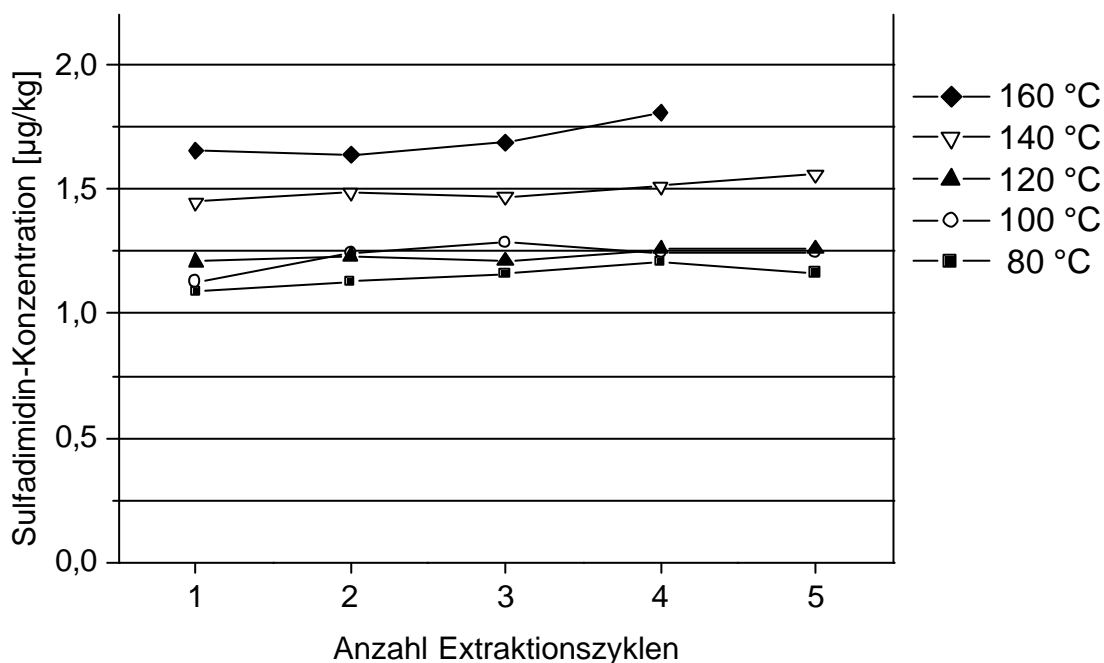


Abbildung 19: *Konzentration an Sulfadimidin in einer Schweinegülle in Abhängigkeit von der Anzahl der Extraktionszyklen [mg/kg]*

Mittelwert aus Bestimmung auf zwei ELISA-Platten mit jeweiliger dreifach-Bestimmung

Insgesamt lässt sich aus den Optimierungen dieser beiden Parameter folgern, dass es bei der Extraktion von Sulfadimidin aus Schweinegülle nicht so entscheidend ist, mit wie viel Zyklen extrahiert wird, sondern dass dies möglichst bei hoher Temperatur geschieht.

Durch die Messung der Extrakte per ELISA entstehen allerdings noch weitere Fragestellungen:

1. Kommt es bei höherer Temperatur zur Extraktion weiterer Stoffe, durch die der ELISA-Test beeinflusst wird?
2. Täuschen mitextrahierte Metaboliten durch ihre Kreuzreaktivität im ELISA-Test Sulfadimidin-Gehalte vor?
3. Bilden vorhandene Metaboliten bei der Aufarbeitung die Ursprungssubstanz zurück?
4. Lassen sich die höheren Bestimmungen mit zunehmender Temperatur allein auf die quantitativere Extraktion von Sulfadimidin zurückführen?

Zu 1.: Mitextrahierte Matrixbestandteile sind grundsätzlich in der Lage, den Test zu beeinflussen, falls sie zu einer Störung des Enzyms oder des Antikörpers führen. Dies kann dazu führen, dass höhere Gehalte vorgetäuscht werden.

Durch Dotierungen zur Bestimmung der Wiederfindungsrate (siehe Kap. 3.2.5.3 und 4.1.4.3) konnte allerdings gezeigt werden, dass aus der Gülle mitextrahierte Matrixbestandteile den Sulfadimidin-Test nicht negativ beeinflussen. Sie führen bei den vorgenommenen Verdünnungen nicht zu Überbestimmungen.

Zu 2.: Zusätzlich zur ELISA-Messung wurden die ASE-Extrakte nach Reinigung und Aufkonzentrierung durch SPE⁵⁰ auch per HPLC-UV gemessen. Dabei konnten die ELISA-Messungen bestätigt werden. Hätten in den Extrakten deutliche Gehalte an kreuzreaktiven Metaboliten vorgelegen, so hätte der SDM-Gehalt in der ELISA-Messung höher liegen müssen als bei der HPLC-Bestimmung, da ein Teil der Metaboliten bei der Festphasenextraktion nicht miterfasst würde, bzw. sie andere chromatographische Trennbedingungen erfordern.

⁵⁰ Reinigung für HPLC

Ein SPE-Reinigungsschritt vor der HPLC-Messung war aufgrund der Matrix erforderlich; die Messung direkt aus einer Güllavorverdünnung brachte Unterbestimmungen, da die Integration des Sulfadimidinpeaks (die Basislinie ist am Anfang noch sehr unruhig und abfallend, bedingt durch Huminsäureelution) nur ungenügend geschehen konnte. Die Abtrennung eines Teils der Matrix führte zu Chromatogrammen, durch die Sulfadimidin besser und sauberer zu integrieren war.

Zu 3.: Metaboliten der Sulfonamide können während der Güllelagerung wieder die Ursprungssubstanz zurückbilden, wie Langhammer feststellen konnte [117]. Ob dies auch während der Aufarbeitung bei der Extraktion geschehen kann, konnte hier nicht geklärt werden, da dafür eine HPLC-Vergleichsmessung direkt aus der Gülle ohne ASE und SPE-Reinigungsschritte erforderlich wäre, was aber aufgrund der Matrix nicht möglich ist. ELISA-Messungen vor und nach der Aufarbeitung bieten dazu keine Information, da Metaboliten ebenfalls an den Antikörper binden können und somit SDM-Gehalte vortäuschen.

Zu 4.: Kreuzreaktive Metaboliten im Extrakt führten hier nicht zu höheren SDM-Gehalten (siehe 2.). Die Matrix in den Extrakten führte ebenfalls nicht zu höheren Werten. Daher ist es wahrscheinlich, dass auch die Matrix in Extrakten, die mit unterschiedlichen Temperaturprogrammen erhalten wurden, nicht zu anderen Ergebnissen führte. Der Grund für die höheren Gehalte an Sulfadimidin bei höherer Temperatur liegt also in der besseren Extrahierbarkeit.

4.1.4.2 Einfluss von Azid

Die Azid-Gabe bewirkt eine Sterilisation der Probe, so dass während der Aufarbeitung kein weiterer mikrobieller Abbau der Substanzen geschehen kann. Da Azid aber auch den ELISA-Test durch Hemmung der Peroxidase und Störung des Antikörpers beeinflussen kann, ist es erforderlich, dass der Gehalt in der Messlösung so niedrig liegt, dass die Probenmessung nicht beeinträchtigt wird. Mit der nochmaligen 100fachen Verdünnung der Vorverdünnung vor der Messung war dies gewährleistet.

Es wurde erkannt, dass die Zugabe von Azid in den erwähnten Konzentrationen keinen besonderen Einfluss auf die Extrahierbarkeit der Substanzen bewirkt. Da ein Einfluss auf den ELISA-Test ausgeschlossen werden konnte (dafür waren die Azid-Gehalte in den verdünnten Extrakten zu gering), heißt das, dass während der Zeit der Extraktion der mikrobielle Abbau keinen großen Effekt hatte, weshalb auch die Extraktionsausbeuten nicht besser wurden. Möglicherweise ist aber eine Azid-Zugabe zur Lagerung von Proben vorteilhaft und bei Proben, die nicht sofort analysiert werden, sogar angemessen, zumal ja die Extraktion und Messung nicht schlechter werden.

4.1.4.3 Wiederfindungsrate, Test-Beeinflussung

Wiederfindungsrate

Durch Korrelation der Istkonzentrationen mit den Sollkonzentrationen aus den Ergebnissen von Kap. 3.2.5.3 erhält man die Wiederfindungsrate als Steigung einer linearen Regression (siehe Abb. 20). Alternativ kann man mittlere Wiederfindungen auch nach anderen Verfahren erhalten, die hier aber weniger gut geeignet sind (siehe Kap. 4.1.3.3).

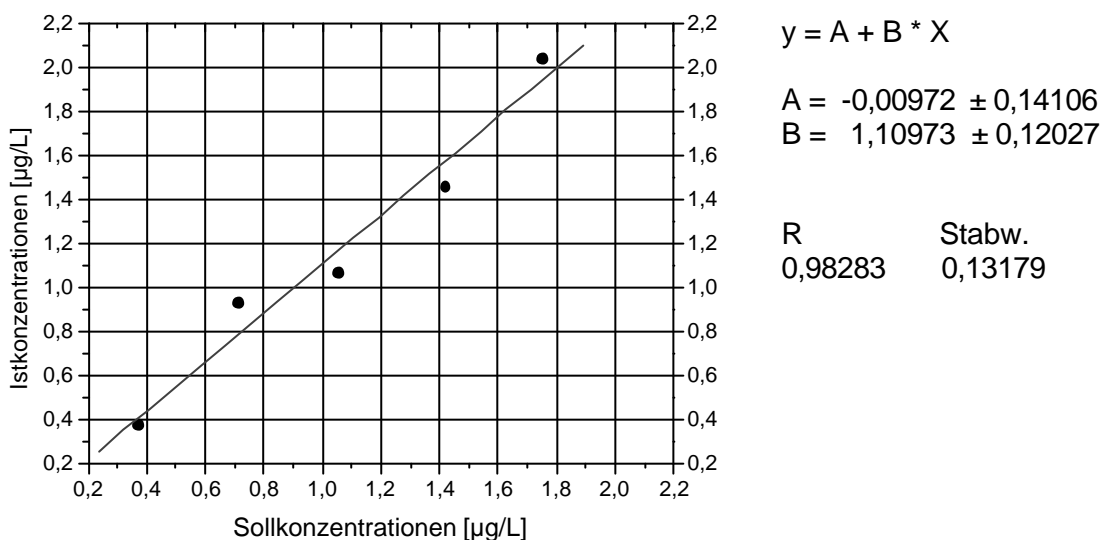


Abbildung 20: Darstellung der Istkonzentrationen [µg/L] aus ELISA-Messung von Sulfadimidin und der Sollkonzentrationen [µg/L], nach Dotierung und ASE-Extraktion von Schweinegülle, gemessen in den Verdünnungen

Man erkennt eine gute Korrelation mit einer Steigung von 1,11. Dies bedeutet eine Wiederfindungsrate von 111 ± 12 %. Die Behandlung der Proben bei einer Temperatur von 100 °C führte also auch auf verschiedenen Konzentrationsstufen zu einer gleichmäßigen Extraktionsrate und zu Lösungen, die ohne Probleme per ELISA gemessen werden konnten, zumal auch die Matrix keine besonderen Effekte zeigte. Eine Beeinflussung scheint weder auf kleinen, noch auf größeren Konzentrationsstufen zu erfolgen. Sie hätte dazu führen können, dass es zu großen Überbestimmungen gekommen wäre oder keine Unterscheidung zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen mehr zu sehen gewesen wäre. Sulfadimidin lässt sich also

aus einer Matrix wie Gülle (selbst einige Stunden nach Dotierung) vollständig und ohne Abbau extrahieren und bei entsprechender Verdünnung ohne Probleme per ELISA messen.

Test-Beeinflussung

Neben der Wiederfindungsrate, die sich bei der Extraktion von Gülle ergab, wurde die WDF ermittelt, die man bei direkter Messung aus dotierter Gülle erhält. Damit sollte erkannt werden, ob eine Bestimmung aus einer Gülleverdünnung, ohne weitere Probenvorbereitung möglich ist. Aus der linearen Regression durch Auftragen der Istkonzentrationen gegen die Sollkonzentrationen wurde anhand der Steigung die mittlere WDF bestimmt (siehe Abb. 21).

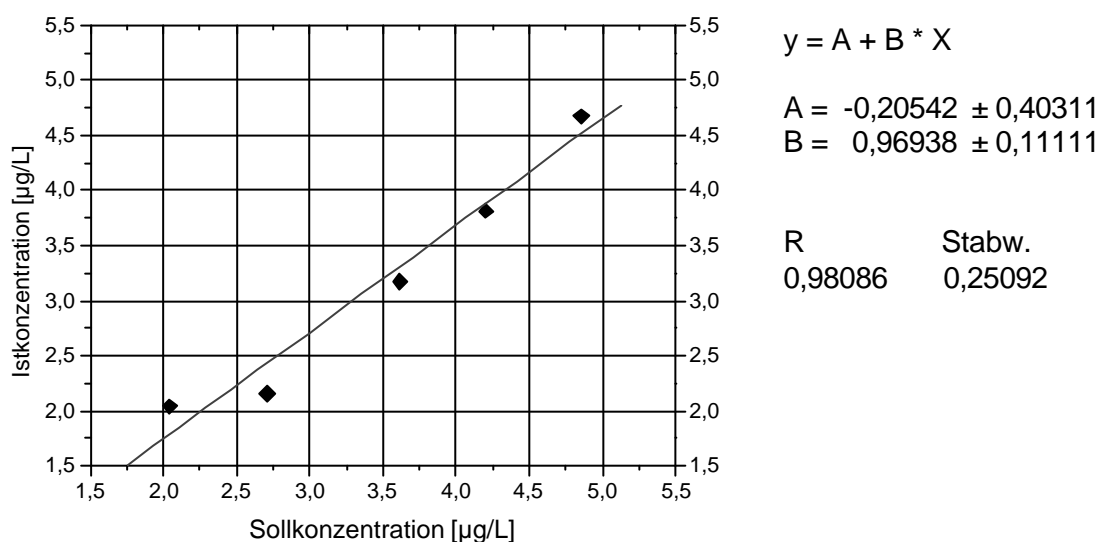


Abbildung 21: *Darstellung der Istkonzentrationen [µg/L] aus der ELISA-Messung von Sulfadimidin und der Sollkonzentrationen [µg/L], nach Dotierung von Schweinegülle; gemessen in der Verdünnung ohne vorherige Extraktion*

Die Korrelation bringt eine Steigung von 0,969. Dies bedeutet eine Wiederfindung von 97 ± 11 %. Trotz der erheblichen Matrix, die eine direkte Messung von Gülle per HPLC-UV ausschloss, ließen sich solche Proben sogar direkt per ELISA ohne Überbestimmung und ohne Beeinflussung der SDM-Gehalte bestimmen. Die direkte Messung der flüssigen Phase erfasste allerdings nur die Antibiotika, die dort frei vorlagen und nicht solche, die an Festbestandteile adsorbiert waren. Soll die Partikelphase auch mitberücksichtigt werden, ist eine Extraktion, wie z.B. die ASE erforderlich.

4.1.5 Abbauprobungen und Stabilität von Antibiotika in Böden

Mit der Ausbringung von antibiotikahaltiger Gülle auf landwirtschaftlich genutzte Flächen ist ein Eintrag auf und in Böden verbunden [129, 137]. Liegen zu vermutende Konzentrationen in Gülle im mg/kg-Bereich, so werden die Gehalte in Böden zumeist deutlich geringer sein und eher im µg/kg-Bereich liegen. Höhere Konzentrationen sind kurz nach der Ausbringung in den obersten Schichten oder in Güllekrusten zu erwarten (siehe Einleitung, Kap. 2.7.2 b, c und Kap. 2.8.2). Wie aber verhalten sich die Antibiotika im Boden? Liegen sie dort stark gebunden vor, werden sie abgebaut, ist eine Akkumulation möglich und in wie weit sind sie noch verfügbar, bzw. extrahierbar?

Bei den in Kap. 3.2.6 beschriebenen Abbauprobungen, wurden verschiedene Bedingungen berücksichtigt, die auch in der Praxis nach der Gülleausbringung auftreten können. So lagen die Dotierungen der Böden in einem Konzentrationsbereich, wie er nach direkter Applikation im Oberboden oder in Güllekrusten zu finden ist (siehe Kap. 2.7.2.3). Außerdem wurde bei dem Ansatz durch die Zugabe von 20 mL Lösung ein wassergesättigter Boden simuliert, wie er manchmal nach Gülleapplikation oder bei Starkregen- oder Permanentregenereignissen auftreten kann. Die Sättigung endete erst während der Trocknung, die über einen Zeitraum von sechs Tagen verlief. Dies führte zu gealterten Rückständen, wie sie auch in Realbodenproben vorliegen (es sei denn, Bodenproben werden direkt nach Gülleausbringung genommen). Die Entfernung der flüssigen Phase hatte außerdem den Vorteil, dass allein der Boden extrahiert wurde. Hätte zusätzlich eine wässrige Phase vorgelegen, hätte es sein können, dass Antibiotika noch in der flüssigen Phase sind und somit ebenfalls miterfasst werden, obwohl sie ja im eigentlichen Sinne nicht vom Boden extrahiert worden sind.

Von den neun Antibiotika aus dem Standardmix, mit dem die Bodenproben dotiert worden waren, konnten nach der Alterungszeit nur noch die Sulfonamide Sulfadimidin, Sulfadiazin und Sulfamethoxazol in den Proben gemessen werden. Tetracycline und Penicilline waren einerseits aufgrund der niedrigen Wiederfindungsraten von etwa 10 % bei dem verwendeten Verfahren der Festphasenextraktion, andererseits aber aufgrund ihrer Substanzeigenschaften (Adsorption an Boden, schwer extrahierbar, geringe Stabilität; siehe Kap. 2.7.1) in den Extrakten nicht mehr nachweisbar.

Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich daher nur auf die Sulfonamide, die in jeder der dotierten Bodenproben wiedergefunden wurden.

4.1.5.1 Vergleich der Extraktionsbedingungen

Zur Extraktion wurden drei verschiedene Bedingungen gewählt. Da es sich um sehr verschiedene Böden handelte, konnte es sein, dass eine Extraktionsvariante sich zwar gut für den einen Boden eignet, bei einem anderen hingegen aufgrund einer anderen Adsorptionsart der Stoffe nur dürftige Ergebnisse liefert. Daher sollte mit verschiedenen Bedingungen untersucht werden, ob innerhalb eines Bodens, z.B. mit unterschiedlicher Temperatur, Stoffe auch unterschiedlich desorbiert werden.

Die Methoden 1 und 2 (Extraktion bei 40 °C) lieferten sehr ähnliche Ergebnisse. Es scheint daher keine Rolle zu spielen, ob während der ASE mehrere Zyklen vorgenommen werden, oder aber ein einziger mit längerer Zeit. Dies zeigte sich auch schon bei der Extraktion von Gülleproben in Kap. 3.8.1. Die Extraktionsausbeuten, bei verschiedenen Böden, von den drei Sulfonamiden waren bei beiden Methoden etwa gleich hoch. Methode 3 (Extraktion bei 100 °C) unterschied sich zum Teil jedoch deutlich von den anderen. So ließ sich damit aus Boden 2.1 viel weniger extrahieren, als bei 40 °C, bei Boden 2.2 etwa gleich viel und bei Boden 2.3 deutlich mehr. Dies bezieht sich auf die Extraktion von allen drei Substanzen und bei allen Konzentrationsstufen (siehe Abb. 22).

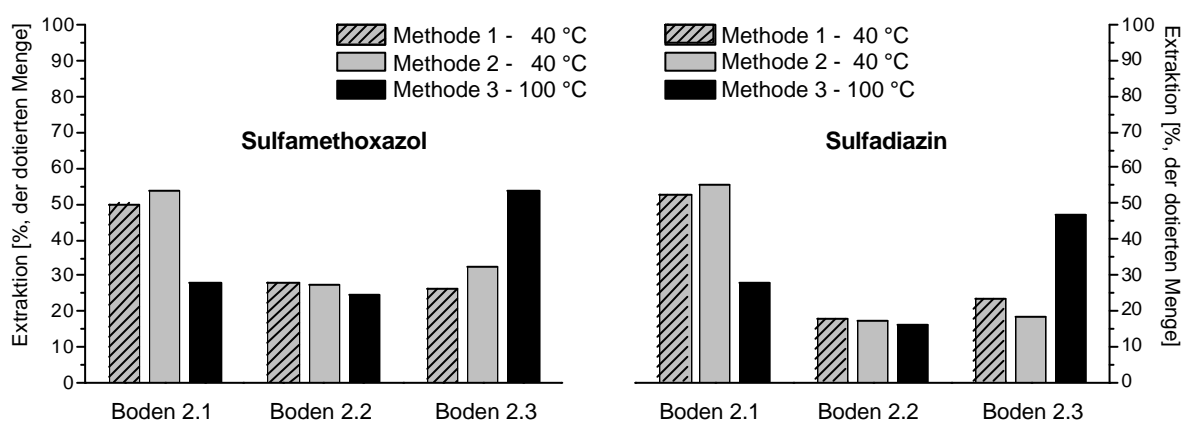


Abbildung 22: Einfluss der Extraktionstemperatur auf die Ausbeute, dargestellt sind die Raten bei der mittleren Konzentrationsstufe von 2 mg/kg Boden für Sulfamethoxazol und Sulfadiazin

Die Erklärung für diese sehr unterschiedlichen Ergebnisse bei verschiedenen Bodenarten ist spekulativ. Möglicherweise ist es einfach die unterschiedliche Bindungsart der Substanzen an die Bodenmatrix, die in dem einen Fall besser durch hohe Temperatur gelöst werden kann, im anderen eher durch niedrige Temperatur aber mit längerer Einwirkzeit des Lösungsmittelgemisches.

4.1.5.2 Einfluss der Bodenart

Der Einfluss des Bodens auf die Extraktionsfähigkeit ist sehr bedeutsam. Erschwert wird eine Aussage durch die nicht nur unterschiedlich hohen Ergebnisse der Extraktionen bei verschiedenen Temperaturen, sondern vielmehr durch die unterschiedliche Tendenz. Betrachtet man die Extraktionsausbeuten bei 40 °C (3 x 10' bzw. 1 x 30'), so erhielt man bei dem Sandboden 2.1 die höchsten Ergebnisse. Aus dem lehmigen Sandboden 2.3 war weniger zu extrahieren und aus Boden 2.2 nochmals weniger. Dieses Bild war bei allen drei Sulfonamiden zu erkennen und trat bei allen Konzentrationsstufen auf (siehe Abb. 23).

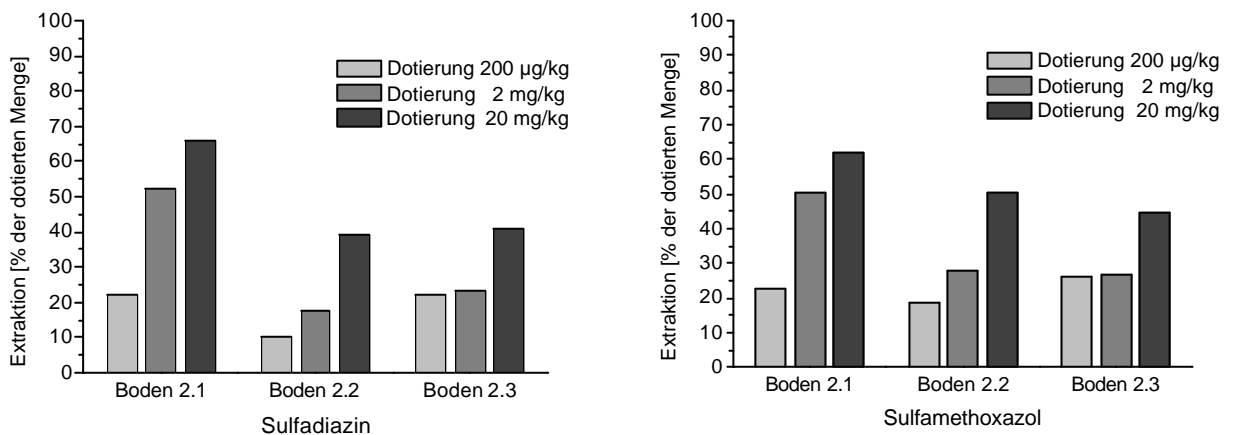


Abbildung 23: Einfluss des Bodens auf die Extraktionsausbeute, am Beispiel von Sulfadiazin und Sulfamethoxazol; dargestellt sind die Ausbeuten mit der Extraktionsmethode 1 (40 °C) auf verschiedenen Konzentrationsstufen

Betrachtet man dagegen die Ausbeuten bei der Extraktion mit 100 °C, so ergibt sich ein anderes Bild. Mit 100 °C wurden die Sulfonamide von Boden 2.3 am besten extrahiert. Der

Sandboden 2.1 ergab etwas schlechtere Extraktionsausbeuten und Boden 2.2 lieferte zumeist noch niedrigere Werte (siehe Abb. 24)

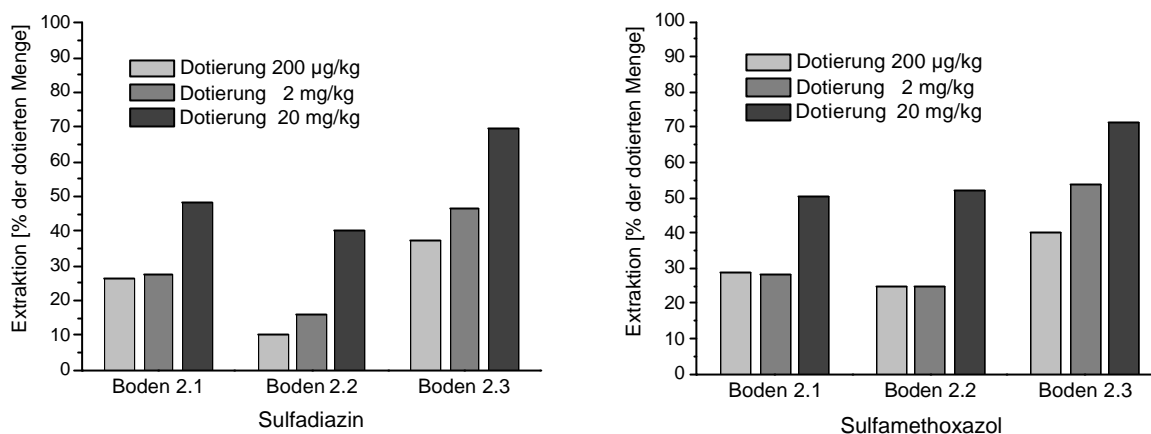


Abbildung 24: Einfluss des Bodens auf die Extraktionsausbeute, am Beispiel von Sulfadiazin und Sulfamethoxazol; dargestellt sind die Ausbeuten mit der Extraktionsmethode 3 (100 °C) auf verschiedenen Konzentrationsstufen

Übereinstimmend ist bei den verschiedenen Extraktionsmethoden, dass aus Boden 2.2 mit dem höchsten Gehalt an organischem Kohlenstoff am wenigstens zu extrahieren war. Bezüglich des Sandbodens wäre zu erwarten gewesen, dass aus ihm die Stoffe (wie mit Methode 1 und 2 erfolgt) am besten zu extrahieren wären. Dies war bei 100 °C (1 x 10') jedoch nicht der Fall. Angenommen, die Substanzen liegen in dem Sandboden mit dem geringeren Anteil an organischer Kohlenstoffmasse nicht so stark gebunden vor, so wäre für deren Desorption nicht so sehr die Temperatur relevant, als eher die Dauer der Extraktion, die bei den Methoden 1 und 2 insgesamt 30 min beträgt. In einem lehmigen Sandboden, wie Boden 2.3, der einen etwas höheren Kohlenstoffanteil aufweist, wird hingegen die Bindung der Substanzen an Bodenpartikel eine andere und vermutlich stärkere sein. Um sie zu desorbieren reicht eine Temperatur von 40 °C nicht so aus, wie eine von 100 °C. Entscheidender ist hier also nicht die Dauer der Einwirkung, sondern die Temperatur, um überhaupt eine Lösung der Bindung zu bewirken.

Je nach Bodenart ist daher eine unterschiedliche Extraktionsweise erforderlich, um eine ähnliche Ausbeute zu erhalten. Um die Unterschiedlichkeit bei Bodenproben zu berücksichtigen, und eine weitgehende Desorption zu gewährleisten, müsste sowohl eine hohe Extraktionstemperatur, als auch eine genügende Extraktionsdauer verwendet werden (bei Realproben wurde daher eine Extraktion bei 100 °C mit 3 x 10' durchgeführt, siehe Kap. 3.2.10).

Die Unterschiede zwischen den Böden 2.1 und 2.3 zeigen also nicht unbedingt einen anderen Abbau der Substanzen, als vielmehr die unterschiedliche Bindungsart, die je nach Verfahren (Temperatur und Zeit) besser oder schlechter gelöst werden kann.

Die maximale Extraktionsausbeute war bei den Böden 2.1 und 2.3 etwa gleich hoch und betrug ca. 70 %. Dies deutet darauf hin, dass bei beiden auch etwa die gleiche Abbaurate vorlag. Anders hingegen sah es bei Boden 2.2 aus, aus dem die Extraktionsausbeute höchstens 50 % bei SMX, 40 % bei SDZ und 35 % bei SDM betrug und somit egal mit welchem Verfahren niedriger war, als bei den anderen Böden. Dass hier weder das eine, noch das andere Verfahren ähnliche Extraktionsausbeuten wie bei den anderen Böden erbringen kann, mag daran liegen, dass hier ein stärkerer „Abbau“ der Substanzen erfolgt ist (entweder durch wirklichen Abbau, oder durch irreversible Adsorption). Mit einem höheren Kohlenstoffanteil von 2,3 % ist es auch wahrscheinlich, dass erstens eine erhöhte Mikroflora und zweitens ein anderes Bodengefüge vorlag.

4.1.5.3 Substanzspezifische Unterschiede

Zwischen den Substanzen bestehen nur geringe strukturelle Unterschiede. Daher waren auch die Ausbeuten der drei Sulfonamide relativ ähnlich. In Boden 2.1 zeigten Sulfamethoxazol und Sulfadiazin sehr ähnliche Extraktionsraten, wohingegen die von Sulfadimidin etwa 10 % darunter blieben. Auch in Boden 2.3 lagen die SDM-Werte meist etwas unter denen der anderen Sulfonamide. In Boden 2.2 verhielten sich SDZ und SDM sehr ähnlich, auch hier zeigte SMX wieder die höchsten Ausbeuten.

4.1.5.4 Einfluss der Sterilisation

Sofern der Abbau der Substanzen im Boden hauptsächlich mikrobiologisch durch Bakterien geschieht, könnte man dies anhand der Azidvariante erkennen, da hierbei die Wiederfindung der Substanzen höher wäre. Die Mikroorganismen würden durch das Azid in ihrem Wachstum gehemmt und könnten daher Stoffe, wie die Antibiotika, weniger gut abbauen.

Würde kein Unterschied erkennbar sein, so hieße das, dass kaum mikrobieller Abbau geschieht. Die Tatsache, dass nicht 100 % der Substanzen wiedergefunden werden, wäre dann dadurch begründet, dass eine irreversible Bindung an Bodenmatrix geschieht, oder ein nicht-biologischer Abbau (Oxidation, Photabbau etc.) erfolgt.

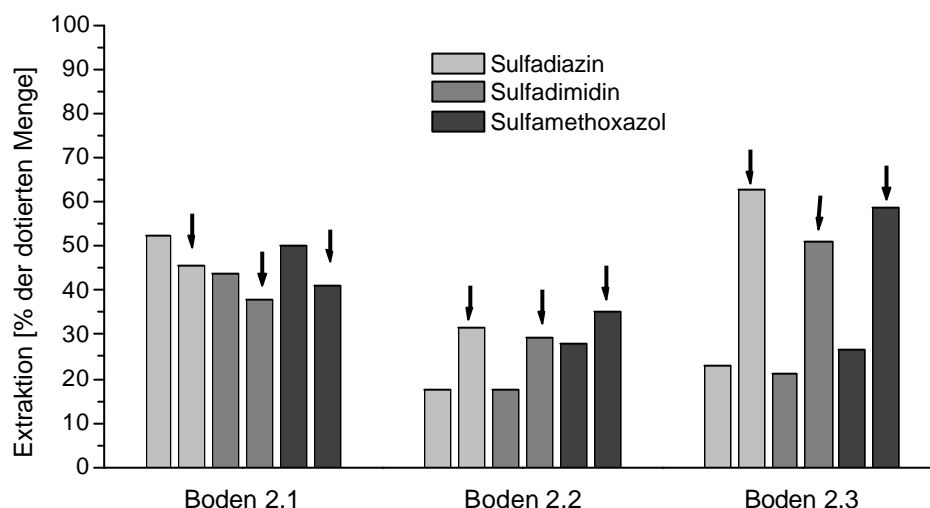


Abbildung 25: Einfluss von Azid auf die Extraktion von Böden. Dotierungsstufe 2 mg/kg. Extraktion mit Methode 1 (40 °C, 3 x 10⁻²); dargestellt sind nebeneinander die nicht-Azid-Variante und die Azidvariante (mit Pfeil markiert)

Man erkennt, dass in Boden 2.1 die Azidzugabe kaum eine Auswirkung auf die Gehalte hatte. Da Boden 2.1 ein Sandboden mit relativ geringem Gehalt an organischem Kohlenstoff ist, wird hierin die mikrobiologische Aktivität sowieso schon geringer sein, als in den anderen Böden. In Boden 2.2 bewirkt die Azidzugabe erhöhte Extraktionsraten. Vor allem in Boden 2.3 ist der Effekt des Azids zu erkennen. Hier bewirkt die Zugabe, dass mehr als das Doppelte

an Substanz unmetabolisiert extrahiert werden kann. Der Abbau ist in Boden 2.3 also vor allem durch Mikroorganismen bedingt und kann durch die Sterilisierung weitgehend unterbunden werden, so dass statt 20-25 % der Substanzmenge nun 50-60 % extrahiert werden können. Der Rest ist entweder auf anderem Wege abgebaut oder fest an die Matrix gebunden.

4.1.5.5 Konzentrationsabhängigkeit der Extraktion

In Abb. 23 und 24 erkennt man, dass umso mehr von den Antibiotika aus den Böden extrahierbar war, je höher die Konzentrationen von ihnen waren. Auf der kleinsten Konzentrationsstufe ließ sich am wenigsten wiederfinden, wohingegen auf der höchsten meist über 50 % der Menge erhalten werden konnte. Dies kann zu einem Teil daran liegen, dass in den 12 g Boden eine gewisse Anzahl an Bindungsstellen vorliegt, durch die eine bestimmte Menge der Substanzen fest und nicht-desorbierbar gebunden werden können. Diese einheitliche Menge würde bei der kleinen Konzentrationsstufe einen viel größeren prozentualen Anteil ausmachen, als bei den höheren Stufen.

Wahrscheinlicher ist aber in Anlehnung an den Einfluss der Sterilisation, dass durch die Antibiotika-Zugabe eine Hemmung des Bakterien-Wachstums eintritt, wodurch der Abbau gehemmt wird. Da in den Böden Konzentrationen von 0,2, 2 und 20 mg/kg von neun verschiedenen Antibiotika vorlagen, bzw. die Konzentration der Bodenlösungen 0,1, 1 und 10 mg/L betragen, war damit bei der geringsten Stufe ein mikrobieller Abbau noch nicht unbedingt behindert. Bei der Stufe von 2 mg/kg bzw. 1 mg/L, werden allerdings schon einige Organismen gehemmt, so dass auch die Substanzen weniger stark abgebaut werden können, als es bei ungehemmten Wachstum der Fall ist. Besonders aber bei der Stufe von 20 mg/kg bzw. 10 mg/L geschieht, unter Berücksichtigung, dass hier verschieden wirkende Substanzen dotiert wurden, eine ziemliche Reduzierung der verschiedensten Bakterien. Somit hat man bei dieser Stufe fast ausschließlich den chemischen Abbau, bzw. eine Verminderung der verfügbaren Substanzen durch Adsorption. Dadurch findet man hier höhere prozentuale Anteile der Sulfonamide in den Extrakten wieder, als bei den anderen Dotierungen, bei denen noch ein mikrobieller Abbau erfolgen kann. (siehe Abb. 26).

Allerdings ist die hier verwendete höchste Konzentrationsstufe üblicherweise nicht in realen Bodenproben zu erwarten. Höchstens direkt nach erfolgter Ausbringung, in Güllekrusten oder in Ausscheidungen bei Freilandhaltung könnten solche Spitzenkonzentrationen zu erhalten

sein. Daher ist es auch unwahrscheinlich, dass der Abbau von Antibiotika in Böden, durch ihre antibiotische Wirkung bedingt, stark gehemmt würde. In Realproben würde man eher mit einer moderaten Hemmung, wie bei der mittleren Konzentrationsstufe rechnen.

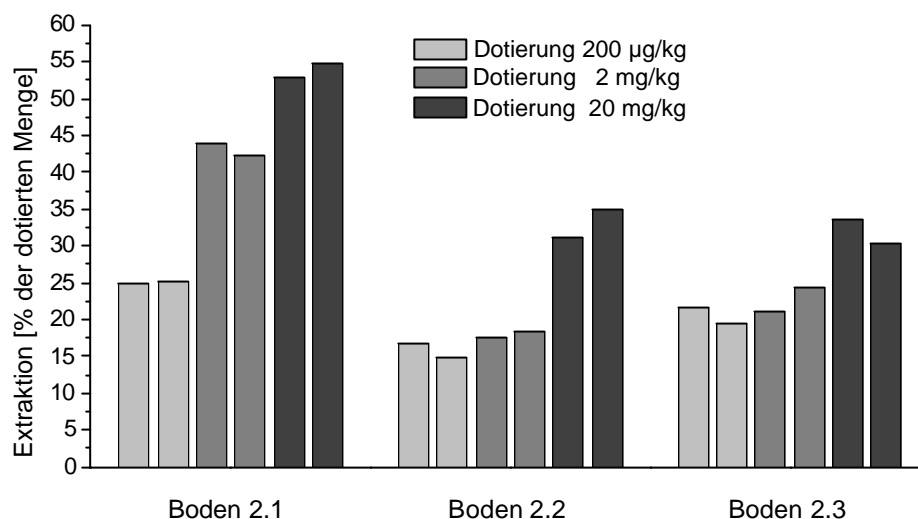


Abbildung 26: Einfluss der Dotierungsstufe auf die Extraktion von Sulfadimidin aus verschiedenen Böden; nebeneinander jeweils die Extraktionen bei 40 °C, mit 3 x 10' (linke Balken) bzw. 1 x 30' (rechte Balken)

Insgesamt zeigt sich durch die Dotierungs- und Extraktionsexperimente, dass je nach Bodenart (auch Einfluss des Gehaltes an organischem Kohlenstoff) eine Extraktionsart sich besser oder schlechter eignet, da es zum einen eine Temperatur- und zum anderen eine Zeitabhängigkeit zu geben scheint. Eine Übertragbarkeit von Extraktions-WDF aus einem Boden auf einen anderen ist daher nur schwer möglich.

Die Unterschiede der Extrahierbarkeit bzw. des Abbaus zwischen den drei Substanzen der Sulfonamid-Gruppe sind eher gering. Absolut gesehen waren bis zu 70 % der zudotierten Menge an SDZ und SMX (SDM 58 %) wieder extrahierbar. Azidzugabe bewirkt durch Hemmung mikrobiellen Wachstums eine Verringerung des Abbaus bei diesen Alterungsproben. Ebenso hat ein hoher Gehalt an Antibiotika einen hemmenden Effekt, so dass der Abbau verlangsamt wird und mehr an Substanz extrahiert werden kann.

4.1.6 Bewertung der Tracersynthesen

Zum Aufbau und zur Optimierung von ELISA-Tests, die zur Messung von Gülle- und Bodenproben dienen sollten, wurden verschiedene Tracer von STR und SDM synthetisiert (siehe Kap. 3.2.8). Diese Tracer wurden mithilfe von Checkerboards und durch ELISA-Tests (beschrieben in Kap. 3.2.7.1) überprüft.

4.1.6.1 Streptomycin

a) Tracer 1 (Periodat-Methode)

Mit Tracer 1 war keine Antikörper-Tracer-Reaktion zu erkennen. Selbst bei hohen Konzentrationen (Verdünnung des Antikörpers 1:1.000, Tracer 1:5.000) wurden im Test keine Kurven erhalten. Das bedeutet, dass der Antikörper den Tracer nicht als Antigen erkannt hat, bzw., dass eine Kopplung möglicherweise nicht stattgefunden hat. Dies kann verschiedene Ursachen haben:

1. die Aktivierung der HRP durch die Oxidation der Seitenkette mit Periodat hat nicht stattgefunden (kann als Grund ausgeschlossen werden, da eine Kopplung der aktivierten HRP an Sulfadimidin sehr wohl stattgefunden hat, wie in Kap. 4.1.6.2 erläutert wird),
2. die Umsetzung des STR mit ABH war nicht vollständig, so dass in der Lösung noch freies ABH vorliegt, das ebenfalls mit der aktivierten HRP koppeln kann,
3. der pH-Wert des Kopplungsschrittes ist nicht geeignet; Da im Teilansatz der STR-Umsetzung Natriumacetat zugegeben und anschließend nicht entfernt wird, bewirkt die Zugabe von 250 μL des Teilansatzes zu der gesamten Fraktion der aktivierten HRP, dass der pH-Wert nicht exakt 9,5 beträgt und somit ungeeignet für die Kopplung ist.
4. die Stabilisierung der Schiffsbasis durch Reduktion mit NaBH_4 führt zu einer Störung/Inaktivierung der Peroxidase oder zur Spaltung der Bindung (kann aber als Grund wohl ausgeschlossen werden, da dies keine Auswirkung auf die Synthese eines ebenso entstandenen SDM-Tracers hatte)

b) Tracer 2+3 (Glutaraldehyd-Methode)

Ein Problem bei dieser Kopplungsmethode kann dadurch auftreten, dass die mit Glutaraldehyd aktivierte Peroxidase auch mit nicht umgesetzten Aminoresten im gleichen Molekül oder aus anderen HRP-Molekülen reagieren kann und somit die Schiffsbasis mit sich selbst bildet. Diese Gefahr wurde einerseits dadurch umgangen, dass der

Aktivierungsschritt zunächst nicht im Alkalischen ablief, und im eigentlichen Kopplungsschritt (basisch) das Streptomycin in hohem Überschuss vorlag. Vom STR waren $2,2 \mu\text{mol} = 4,4 \mu\text{mol}$ Guanidinreste in der Lösung enthalten und $0,05 \mu\text{mol}$ aktivierte HRP, welche 1-3 koppelbare Aminogruppen hat (eingefügte Aldehydgruppen) [173], so dass ein 30-90facher Überschuss an STR vorliegt.

Ein weiteres Problem konnte darin bestehen, dass es ungewiss war, ob die Guanidinreste des STR sich überhaupt mit Aldehydfunktionen umsetzen lassen.

Die Tracer 2 und 3 ergaben im Test keine Kurven und keine spezifischen Antikörper-Tracer Reaktionen. Grund für diesen Misserfolg kann bei Tracer 2 tatsächlich sein, dass eine Kopplung über die Guanidin-Reste nicht geschehen konnte, da ein nucleophiler Angriff der Aminogruppe mit der intermediären positiven Ladung am Stickstoff durch mangelnde Stabilisierung durch die anderen Substituenten am Guanidin-Kohlenstoff unterbunden wird (siehe Reaktion 5).

In der Aktivierung der HRP ist keine Ursache für den Kopplungs-Misserfolg zu sehen, da eine Aktivierung nachweislich stattgefunden hat, wie in Kap. 4.1.6.2 gezeigt wird.

Bezüglich Tracer 3 ist denkbar, dass, wie bei der Periodatmethode, möglicherweise keine vollständige Umsetzung des STR mit ABH stattgefunden hat.

c) **Tracer 4** (CMO-Derivat, aktivierte Ester-Methode)

Tracer 4 zeigte ebenfalls keine spezifischen Antikörper-Tracer Reaktionen. Bei dieser Synthese kann es zu zwei besonderen Schwierigkeiten kommen, die auf der Umsetzung des STR zum CMO-Derivat beruhen. Die eigentliche Kopplung durch die aktivierte Estermethode ist sehr gut zur Reaktion eines carbonsäurehaltigen Moleküls mit HRP geeignet, wie in den noch folgenden Kopplungssuchen mit Sulfonamiden gezeigt wird. Daher lag das Problem bei der Synthese des Tracer 4 in der Reaktion des STR mit CMO.

1. Falls CMO nicht vollständig umgesetzt wurde (obwohl STR im zweifachen Überschuss vorlag), war es zum Teil noch in der gelartigen Substanz vorhanden, die für die weitere Umsetzung verwendet wurde. Daher könnten auch Reste des CMO durch NHS aktiviert worden sein und mit HRP gekoppelt haben.

2. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, dass die Aktivierung mit NHS in DMF mit DCC, also im wasserfreien Ansatz erfolgen muss. Waren noch Reste von Wasser in der gelartigen Substanz eingelagert, so konnte eine weitere Reaktion nicht stattfinden. Allein die Tatsache, dass das STR-CMO kein normaler pulveriger Feststoff war, sondern gelartig, spricht dafür,

dass nicht das komplette Wasser entfernt wurde. Allerdings schien auch in weiteren Ansätzen eine quantitative Entfernung des Wassers nicht möglich.

d) Tracer 5 (direkte Umsetzung)

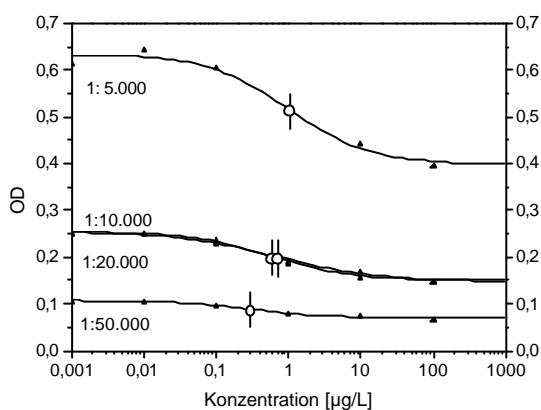
Mit der direkten Kopplung konnte ein Tracer (5) erhalten werden, der eine spezifische Erkennung durch den Antikörper zeigte. Der Test brachte bei Antikörperverdünnungen von 1:1.000 bis 1:4.000, sowie Tracerverdünnungen von 1:5.000 bis 1:10.000 Kurven mit hohen Korrelationskoeffizienten und geringen Standardabweichungen der einzelnen Standardlösungen. Die C-Werte (Testmittelpunkte) lagen im günstigsten Fall bei 6 µg/L. Allerdings war die Farbentwicklung nur sehr schwach, so dass A-Werte von lediglich 0,11 bei D-Werten von 0,06 OD-Einheiten erreicht wurden. Dieser äußerst schmale Bereich kann darauf hindeuten, dass unter Umständen der Antikörper nicht mehr vollkommen intakt war. Normalerweise wird ein Test so eingestellt, dass man A-Werte von etwa 1 bei D-Werten von < 0,1 OD-Einheiten hat. Hier war allerdings ein solcher Wert nicht zu erreichen. Der von der Uni München erhaltene Tracer (mit dem Antikörper mitgeliefert) brachte im Höchstfall A-Werte von 0,26. Da hiermit 15 Monate nach Erhalt (zur Zeit der Testung der selbst synthetisierten Tracer) aber keine Kurven mehr erzeugt werden konnten, deutet dies auf eine starke Verminderung der Aktivität des Antikörpers hin. Somit kann es sein, dass die Tracer 1 bis 4 einfach eine zu geringe Zahl von Kopplungsprodukten zwischen HRP und STR hatten, um mit dieser möglicherweise stark degenerierten Antikörperfraktion eine Reaktion zu zeigen, dass sie aber evtl. bei einer frischen AK-Fraktion sehr wohl erkannt werden könnten und somit die Synthesen doch erfolgreich (wenn auch weniger erfolgreich als die direkte Kopplung) waren.

4.1.6.2 Sulfadimidin

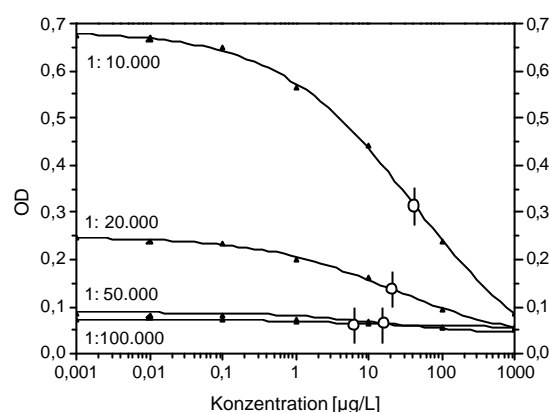
a) Tracer 1 (Periodat-Methode)

Mit der Periodatmethode (Tracer 1) konnte ein Tracer hergestellt werden, der spezifisch an den Antikörper bindet. Selbst bei der Kombination sehr niedriger Konzentrationen von Tracer und Antikörper ließen sich noch Kurven mit guter bis sehr guter Korrelation erhalten. Die höchsten A-Werte (und auch Differenzen zwischen A- und D-Werten) brachte die hier getestete Tracerkonzentration von 1:20.000 in Verbindung mit einer Antikörperverdünnung von 1: 10.000. Allerdings war der C-Wert dann erwartungsgemäß sehr hoch mit 43,9 µg/L, da er um so geringer wird, je stärker Antikörper oder Tracer verdünnt werden [173]. In

Abbildung 27 B sieht man ELISA-Kurven bei fixer Tracerverdünnung von 1:20.000 und variiertes Antikörperverdünnung. Durch kleine Kreise mit vertikalem Strich sind die Testmittelpunkte der Kurven markiert. Wurde eine fixe Antikörperverdünnung von 1:40.000 genommen und die Tracerkonzentration variiert, so wurden die C-Werte mit stärkerer Tracerverdünnung ebenfalls niedriger (Abb. 27 A). Die niedrigsten C-Werte und somit auch Nachweisgrenzen ließen sich hier mit der Kombination AK 1:40.000 und Tracer 1:50.000 erhalten, bei der der C-Wert 0,3 µg/L betrug.



A. Periodatmethode, Tracer 1
Antikörperverdünnung 1:40.000
verschiedene Tracerverdünnungen



B. Periodatmethode, Tracer 1
Tracerverdünnung 1:20.000
verschiedene Antikörperverdünnungen

Abbildung 27: *ELISA-Tests des SDM-Tracers 1; verschiedene Antikörperkonzentrationen und Tracerverdünnungen, die Testmittelpunkte sind als Kreise mit Längsstrich markiert, die Dreiecke geben die Mittelwerte der Standards an*

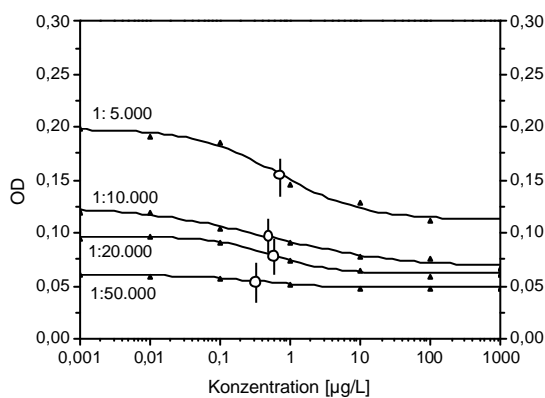
Beim Test zum Vergleich der Tracerverdünnungen fiel auf, dass die Differenzen zwischen A- und D-Wert im Vergleich zu Abb. 27 B deutlich geringer (= ungünstiger) wurden und das Untergrundsignal (D-Wert) anstieg. Grund ist hierfür die unspezifische Bindung von HRP an die Wand der Kavität. Dies kann entweder durch den gekoppelten Tracer geschehen, oder auch durch nicht mit SDM reagierende HRP. Da der Antikörper hier stark verdünnt vorlag (1:40.000), war nicht die gesamte Wand der Kavität belegt, und es konnte zu einer ungewünschten Bindung an die freien Stellen kommen. Der gleiche Effekt trat auch bei dem Test der Tracerverdünnungen des Tracers 2 (Glutaraldehyd-Methode) auf. Unterbunden

werden kann eine testverschlechternde Bindung durch die Blockierung der nicht mit AK beschichteten Wand durch Proteine wie z.B. das im STR-Test verwendete Casein. Allerdings liegt es auch am Tracer selbst, ob er unspezifisch bindet, oder nicht. Das kann von der Kopplungsmethode abhängen, oder von weiteren Stoffen, die in der Tracerlösung vorhanden sind.

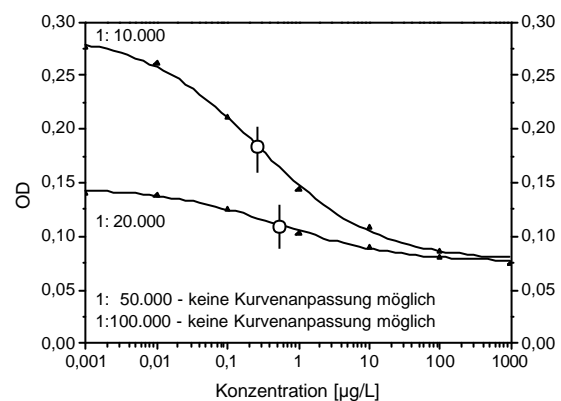
Die Tatsache, dass mit der Kopplungsmethode nach Periodatbehandlung funktionierende Tracer erzeugt werden konnten, zeigt also, dass die Oxidation der Kohlenhydratseitenkette zu Aldehyden geführt hat, die dann weiter koppeln können. Beim STR lag der Grund für die nicht erfolgte spezifische Erkennung also eher im Kopplungsschritt während der Synthese, oder an der Aktivität des Antikörpers.

b) Tracer 2 (Glutaraldehyd-Methode)

Die Kopplung mit der Glutaraldehydmethode führte ebenfalls zu funktionierenden Tracern (siehe Abb 28). Somit hat also die Aktivierung der Peroxidase (durch Einfügen der Aldehydfunktionen an die Aminogruppen) stattgefunden und auch der eigentliche Kopplungsschritt war erfolgreich (bei den STR-Tracern 2 und 3 hg das Problem also nicht an der Aktivierung).



A. Glutaraldehydmethode, Tracer 2
Antikörperverdünnung 1:40.000
verschiedene Tracerverdünnungen



B. Glutaraldehydmethode, Tracer 2
Tracerverdünnung 1:20.000
verschiedene Antikörperverdünnungen

Abbildung 28: *ELISA-Tests des SDM-Tracers 2; verschiedene Antikörperkonzentrationen und Tracerverdünnungen, die Testmittelpunkte sind als Kreise mit Längsstrich markiert, die Dreiecke geben die Mittelwerte der Standards an*

Im Vergleich zu der Periodatmethode ist zu sehen, dass die A-Werte deutlich niedriger lagen (siehe Abb. 28). Bei den hier getesteten Kombinationen lagen sie nicht über 0,3. Zwar sind auch die C-Werte kleiner (immer $< 1 \mu\text{g/L}$) und eine Messung bei einer Differenz von A und D-Wert von 0,15 Einheiten OD ist zwar möglich, aber bevorzugt werden doch größere Differenzen, da damit meist eine größere Messgenauigkeit einhergeht. Waren mit dem Periodat-Tracer selbst bei AK-Verdünnungen von 1:50.000 und 1:100.000 (Tracer 1:20.000) noch auswertbare Kurven zu erhalten, so war dies beim Glutaraldehyd-Tracer nicht möglich (Abb. 28 B). Da die niedrigen C-Werte von $< 1 \mu\text{g/L}$ schon bei höheren Tracer- oder AK-Konzentrationen, als bei SDM-Tracer 1 zu erhalten waren, ist bei Tracer 2 wahrscheinlich weniger SDM an HRP gekoppelt (evtl. geringere Kopplungsdichte), was also auch die effektive Konzentration an Tracer im Test verringert.

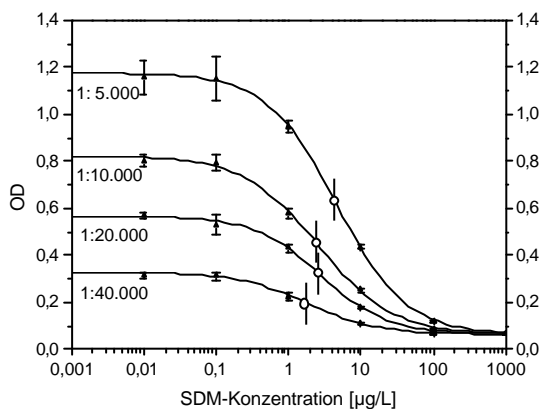
Bezüglich der D-Werte (bzw. Differenz zwischen A- und D-Wert) beim Tracer der Glutaraldehydmethode fällt auf, dass mit der AK-Verdünnung von 1:40.000 (Abb. 28 A) die Wand der Kavität nicht soweit belegt war, dass es nicht auch zu unspezifischer Bindung kommen kann, wie schon in Abb. 27 A zu erkennen war.

c) Tracer 3 + 4 (Säurederivate von SDM, aktivierte Ester-Methode)

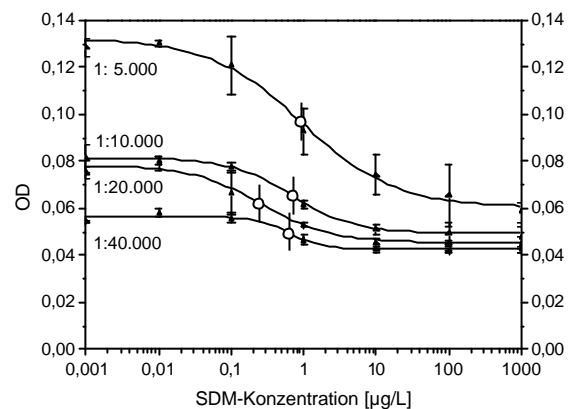
Mit der Herstellung der Säurederivate und der anschließenden Kopplung gemäß der aktivierten Ester-Methode konnten zwei Tracer hergestellt werden, die spezifisch durch den Antikörper gebunden werden konnten. Dabei erwies sich der Tracer mit Bernsteinsäurebrücke (SDM-Tracer 4) als etwas schlechter als SDM-Tracer 3 mit Glutarsäure als Spacer. Der Unterschied besteht bei diesen beiden Tracern lediglich in einer CH_2 -Gruppe des Spacers (Glutarsäure ist die längere Brücke). Die Kopplung hat bei beiden stattgefunden, nur die Erkennung durch den Antikörper ist unterschiedlich. Es kann aber auch sein, dass die Kopplung unterschiedliche Ausbeuten bringt.

Antikörper binden einen Tracer umso stärker, je ähnlicher er dem Immunogen ist, welches zur Immunisierung und Antikörpergewinnung verwendet wird. Im Fall des SDM-Antikörpers wurde die Immunisierung mit einem Immunogen durchgeführt, welches aus SDM bestand, das über eine Azokopplung an ein Protein gebunden wurde. Da diese Azo-Brücke recht kurz ist (sie besteht nur aus $-\text{N}=\text{N}-$), ist es erstaunlich, dass der Tracer mit längerem Spacer bessere Ergebnisse lieferte, als das dem Immunogen ähnlichere SDM-Succinamyl-HRP. Ein Grund für eine möglicherweise schlechtere Ausbeute des Tracer 4 gegenüber Tracer 3 kann in der Bildung eines zyklischen Zwischenproduktes während der Synthese liegen, wodurch die Ausbeute reduziert wird [156]. Im Test selbst zeigte Tracer 4 nämlich sehr geringe C-Werte

von z.T. deutlich unter $1 \mu\text{g/L}$ (Tracer-Verdünnung 1:20.000 bei AK-Verdünnung 1:40.000 ergibt einen C-Wert von $0,26 \mu\text{g/L}$, siehe Abb. 29 B), wohingegen diese bei Tracer 3 selbst bei einer starken Tracerverdünnung von 1:40.000 noch bei $1,8 \mu\text{g/L}$ lagen (Abb. 29 A). Immerhin betrug der A-Wert bei 1:40.000 aber immer noch 0,32, wohingegen der höchste A Wert von SDM-Tracer 4 nur bei 0,13 lag. Daher hat Tracer 3 den Vorteil, dass er auch bei starker Verdünnung (gleichbedeutend mit einer großen Ergiebigkeit in Bezug auf die Anzahl von Tests) noch ausreichende Signale ergibt. Außerdem hat er den Vorteil, dass die Standardabweichungen geringer sind und er kaum ein Untergrundsignal erzeugt. Selbst bei AK-Verdünnungen von 1:40.000, bei der die Kavitätenwände nicht vollständig belegt sind, neigt der Glutarsäure-Tracer 3 nicht zu unspezifischer Adsorption.



A. Glutarsäuretracer, SDM-Tracer 3
Antikörperverdünnung 1:40.000
verschiedene Tracerverdünnungen



B. Bernsteinsäuretracer, SDM-Tracer 4
Antikörperverdünnung 1:40.000
verschiedene Tracerverdünnungen

Abbildung 29: *ELISA-Tests der SDM-Tracer 3 und 4; verschiedene Tracerverdünnungen, die Testmittelpunkte sind als Kreise mit Längsstrich markiert, die Dreiecke geben die Mittelwerte der Standards mit Standardabweichung an*

Auch bei einer geringen Tracerverdünnung von 1:5.000 war der D-Wert nicht höher, als bei 1:40.000 und dies bei einem A-Wert von sogar 1,2. Zu berücksichtigen ist dabei, dass nach der Aufreinigung der Kopplungsprodukte, der Tracer zur Lagerung 1:1 mit Glycerol verdünnt worden ist, so dass die Verdünnungen eigentlich doppelt so hoch sind und somit die hier getesteten Tracerverdünnungen bis zu 1:80.000 betragen.

Fazit der SDM-Tracersynthesen

Insgesamt ergaben alle Synthesen von SDM mit HRP Tracer, die vom Antikörper spezifisch erkannt werden und mit denen ein Test möglich ist. Am besten eignet sich Tracer 3, da er sehr stark verdünnt werden kann, Testmittelwerte im unteren $\mu\text{g/L}$ Bereich ergibt und kaum unspezifische Adsorption zeigt.

4.1.7 Entwicklung eines ELISA-Test auf Sulfamethoxazol

Es wurde ein ELISA-Test auf SMX (hum.) vollständig aufgebaut, der nach Anpassung auch eine Messung von Abwasserproben ermöglichen sollte. Für die erfolgreiche Testentwicklung wurden die einzelnen Syntheseprodukte und die Antikörper genau untersucht und getestet.

4.1.7.1 Test der Zwischenprodukte (Derivatsynthese)

HPLC-UV-Messung

Die Messung des isolierten Succ-SMX (Reinigung bestand aus Waschschritten mit Essigsäure und Wasser) ergab einen Peak nahe dem Einspritzpeak (5,16 min) und einen weiteren, sehr kleinen, der SMX sein dürfte (10,39 min). Das Verhältnis der Peakflächen betrug dabei 48:1. Weitere Peaks traten im Chromatogramm nicht auf. Der erste Peak sollte daher zum Succ-SMX gehören, zumal die erhöhte Polarität sich in einer früheren Elution zeigen sollte. Als Produkt waren 1,12 g an ungereinigtem Produkt gewogen worden, was eine Ausbeute von 79 % bedeutet (siehe Abb. 30 oben).

Nach der Aktivierung dieses Succ-SMX mit NHS und DCC in DMF wurde nach der Umsetzung der Überstand ebenfalls gemessen. Im Chromatogramm dieser Lösung waren ebenfalls Succ-SMX (5,18 min) und SMX (10,36 min) zu erkennen (siehe Abb. 30 unten). Des weiteren war ein sehr großer Peak zu sehen (17,76 min), der von der Fläche 4,5 mal so groß wie der des Succ-SMX war. Dies sollte NHS-Succ-SMX sein, welches deutlich unpolarer ist. Das Verhältnis von Succ-SMX zu SMX hat sich nach der Aktivierung, durch Abreagieren des Succ-SMX, deutlich verringert. Es betrug danach nur noch etwa 8:1. Außerdem war noch ein weiterer Peak einer unbekannt Substanz (8,48 min) aufgetaucht (möglicherweise SMX-Succ-SMX, durch Reaktion von aktiviertem NHS-Succ-SMX mit der Aminogruppe des in Spuren vorhandenen SMX).

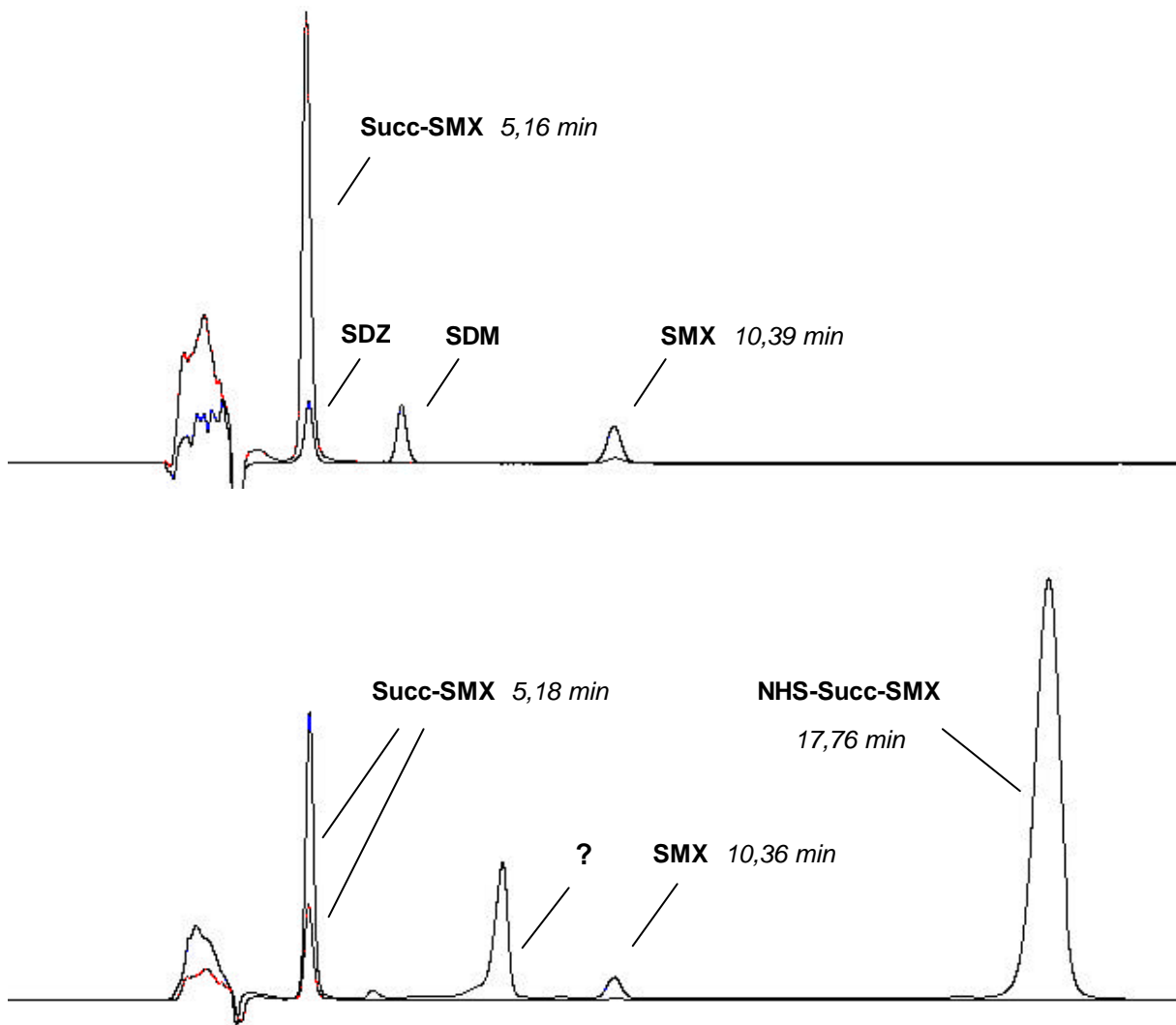


Abbildung 30: *übereinandergelegte Chromatogramme eines Standardmixes und des ersten Zwischenproduktes Succ-SMX (oben); übereinandergelegte Chromatogramme des aktivierten Esters NHS-Succ-SMX und des Zwischenproduktes Succ-SMX (unten)*

Direkte MS-Messung

Im Negativionen-Modus erhielt man bei Messung des Produktes der Veresterung von SMX mit Bernsteinsäure im Masse/Ladungs-Bereich von 200-1600 die m/z -Verhältnisse 352,0 und 252,0. Succ-SMX hat die molare Masse von 353,35 g/mol, reines SMX 253,3 g/mol.

Bei positiver Ionisation erhielt man viele verschiedene Massen, darunter auch die m/z 354. Das Tochterionenspektrum der Masse 354 bei positiver Ionisation ergab als deutlich stärkstes Signal 256, welches ein Ion des SMX sein dürfte. Die weitere Ionisation dieses Signals ergab m/z 192,1, welche durch Abspaltung des 5-Methyl-3-isoxazolyl-Ringes ein Derivat des

Sulfanilamides darstellen kann. Es konnte also die Anwesenheit von Succ-SMX in dem Produkt nachgewiesen werden.

Der aus diesem Produkt hergestellte und vermessene aktivierte Ester ergab im Positivionen-Modus unter anderem m/z 451,3, bei negativer Ionisation m/z 449,0, aber auch wieder 352,0 und 252,1. Eine weitere Aufnahme von Tochterionenspektren des m/z 449,0 war aufgrund der geringen Signalintensität⁵¹ nicht möglich. NHS-Succ-SMX besitzt die molare Masse von 450,4 g/mol.

4.1.7.2 Kopplung von SMX an Peroxidase (Tracersynthese)

Der Test des SMX-Tracers in einem ELISA-Format mit einem SDM-Antikörper und SDM-Standards ergab tatsächlich eine Kurve und zeigte bei einer Tracerverdünnung von 1:100 und einer normalen Antikörperverdünnung von 1:40.000 sogar einen A-Wert von 0,6 und einen C-Wert von 0,36 (siehe Abb. 31). Und dies sogar, obwohl die Kopplung über eine Bernsteinsäurebrücke an die HRP geschah und nicht über eine Glutarsäurebrücke, die bei SDM einen deutlich besseren Tracer ergab.

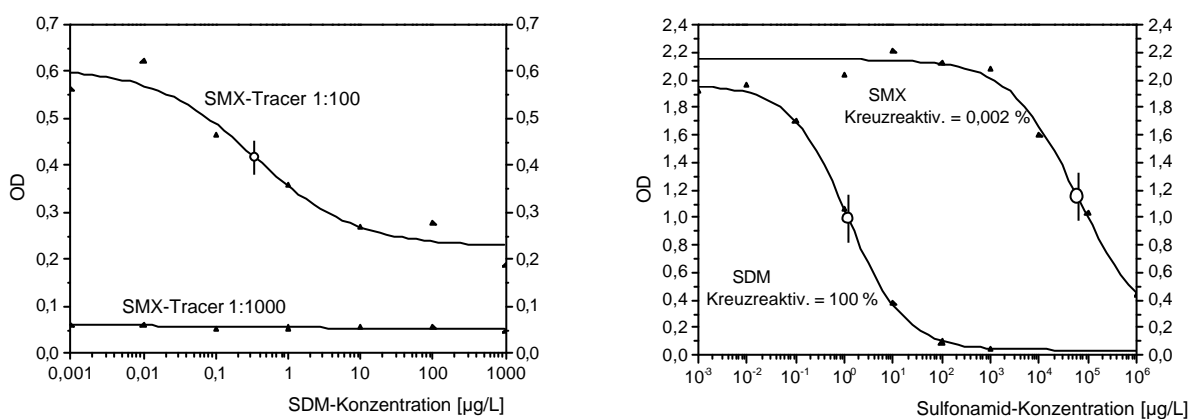


Abbildung 31: *Test des SMX-Bernsteinsäure-Tracers im SDM-Testformat (SDM-AK: 1:40.000, SMX-Tracer), Kreuzreaktivität des SDM-Antikörpers gegen SMX bei Verwendung des SDM-Glutarsäure-Tracers 1:10.000; die Testmittelpunkte sind als Kreise mit Längsstrich markiert*

⁵¹ NHS-Succ-SMX

Die geringe Signalintensität kann daraus resultieren, dass dieses aktivierte Zwischenprodukt nicht sonderlich stabil ist, und bei Zugabe von Wasser (Wasser muss bei der Aktivierung abgefangen werden) und Essigsäure zum Großteil wieder hydrolysiert.

Mit einer stärkeren Verdünnung des SMX-Tracers (1:1000 und 1:5000) waren keine Kurven zu erhalten, was daran liegt, dass die Kreuzreaktivität des SDM-AK gegenüber SMX bzw. dem SMX-Tracer zu gering ist, um eine Verdrängung von SDM zu besorgen.

Insgesamt zeigt es aber, dass dieser Tracer funktioniert, die Kopplung erfolgreich war, das Zwischenprodukt Succinamyl-SMX entstanden ist und mit ihm weiter die Kopplung an KLH zur Immunogensynthese angegangen werden konnte.

4.1.7.3 Kopplung von SMX an KLH (Immunogensynthese)

Durch den Bradford-Test wurden nach der Kopplung die Fraktionen in der Mikrotiterplatte identifiziert, in denen Protein vorlag. Zudem wurde der Kopplungserfolg von Succ-SMX an KLH durch Proteinbestimmungen vor und nach der Umsetzung mit dem aktivierten Ester bestimmt.

Der Bradford-Test stellt eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen dar. Er beruht auf der Bindung eines Farbstoffes (Coomassie-Brillant-Blau) an Arginyl- und Lysyl-Reste im Protein. Dadurch verändern sich die Absorptionseigenschaften. Die Extinktionsänderung ist proportional zur Menge an Protein in der Probelösung [184, 185] und kann photometrisch gemessen werden. Da es sich hier um eine Bindung des Farbstoffs an Aminoreste handelt, würde ein Anteil von endständigen Aminogruppen, die nicht aus dem Protein stammen, wie dies bei SMX der Fall ist, stören. In den untersuchten Lösungen lag jedoch nur an der Aminogruppe succinyliertes SMX vor, und nur noch Spuren von ursprünglichem SMX.

Die Bestimmungen der Gehalte in den Kavitäten ergaben als Ergebnis das gleiche Bild, wie die direkte photometrische Auslesung der Mikrotiterplatte, bei der allein aufgrund der Trübung erkannt werden konnte, in welchen Kavitäten, die proteinhaltigen Fraktionen vorliegen (siehe Abb. 32). Die Konzentrationen reichten dabei von 0 mg/mL ansteigend bis zu 3 mg/mL und mit späterer Elution von der Sephadex-Säule wieder absinkend auf 0 mg/mL. Diese Gehalte sind jedoch kritisch zu betrachten, da das Bradford Reagenz mit Lysin- und Arginin-Resten reagiert, die möglicherweise einen unterschiedlichen Anteil an der Extinktionsverschiebung haben, und hier einseitig nur Lysinreste mit dem aktivierten Ester reagieren.

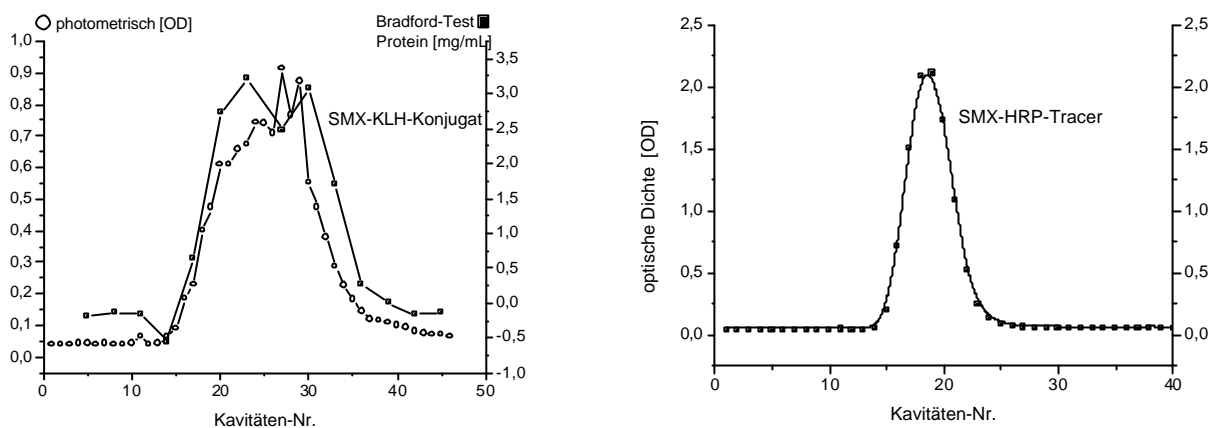


Abbildung 32: Gelfiltrationskurven des SMX-KLH Kopplungsproduktes und des SMX Tracers (zum Vergleich), Bestimmung der Kavitäten photometrisch bei 405 nm, bei SMX-KLH zusätzlich mittels Bradford-Test

Die Konzentration in der Produktlösung (vor der Sephadex-Aufreinigung, also in etwas konzentrierterer Form) betrug 3,7 mg/mL. Im Edukt hingegen lag die Konzentration höher, nämlich bei 3,9 mg/mL, was daher kommt, dass während der Kopplung Lysinreste mit dem aktivierten Ester umgesetzt werden und daher nicht mehr für den Farbstoff zur Verfügung stehen. Daher kann im Produkt der Farbstoff nur mit Argininresten reagieren und mit nicht gekoppelten Lysinresten. Eine Störung der Bestimmung durch die Aminogruppe des SMX (während der Kopplung in Spuren vorhanden) kann bei der Bestimmung nach der Gelfiltration ausgeschlossen werden, da hierdurch ja kleine Moleküle abgetrennt werden, bzw. erst viel später eluieren. Bei der einzelnen Messung vom Produkt ist es hingegen möglich, dass nach der Umsetzung von Bernsteinsäureanhydrid mit SMX gewisse Spuren an SMX noch vorhanden waren, die auch bei der Reinigung des Succ-SMX (Waschen mit Essigsäure und Wasser) nicht abgetrennt wurden und somit auch bei der Aktivierung und der Kopplung vorlagen, wodurch es nicht auszuschließen ist, dass ein Teil des aktivierten Esters auch mit freiem SMX reagierte. Da aber der aktivierte Ester ohnehin in starkem Überschuss in den Kopplungsschritt eingebracht wurde, sollte das die Ausbeute und Kopplungsdichte am KLH nicht sonderlich stören.

Für die einzelne Messung des Produktes bedeutet die Anwesenheit von SMX-Spuren, dass der eigentliche Proteingehalt noch niedriger war (da die Aminogruppe Protein vortäuscht), als die gemessenen 3,7 mg/mL und daher die Kopplung von Succ-SMX an KLH noch effektiver

stattgefunden hat⁵². Somit wird die qualitative Aussage, dass zwischen der Lösung des Eduktes und dem Produkt ein Unterschied besteht, der in der Reaktion von aktiviertem Ester mit KLH begründet ist, noch verstärkt, zumal die HPLC-Messung in Kap. 4.1.7.1 ergab, dass nur Spuren von SMX in Succ-SMX und in NHS-Succ-SMX vorlagen.

In Zusammenfassung der HPLC und der MS-Ergebnisse, sowie der Ergebnisse aus der SMX-Tracer-Synthese lässt sich folgern, dass die Synthese des Succ-SMX erfolgreich war, dass auch die Aktivierung dieser Substanz zum NHS-Succ-SMX stattgefunden hat und eine Kopplung mit Proteinen möglich ist. Lässt sich ein solcher Kopplungserfolg an Peroxidase mithilfe des ELISA-Tests nachweisen, so ist eine Bindung an KLH nur sehr schwierig zu erkennen. Hier kann als Indiz die verringerte Proteinkonzentration beim Bradford-Test dienen, sie lässt aber eine genaue quantitative Aussage nur bedingt zu. Möglichkeiten wären hochauflösende Massenspektrometrie, welche aber bei der Molekülmasse von 8 Mio. Da und einem Anteil von SMX im Molekül von höchstens 2 % (m/m), aufgrund von Auflösung und Verteilung, an ihre Grenzen stößt. Ebenso möglich wäre die Testung von SMX-KLH in einem ELISA-Testformat, in welchem ein peroxidasemarkierter Anti-KLH Antikörper eingesetzt würde. Da beide Systeme nicht zur Verfügung standen bzw. in wirtschaftlich nicht vertretbarer Relation zur Immunisierung stehen, wurde darauf vertraut, dass nach intensiver Testung der Zwischen- und Aktivierungsprodukte, und der erfolgreichen Bindung an ein anderes Protein, auch die Kopplung an KLH zum Erfolg geführt hat und mit diesem Produkt somit eine Immunisierung möglich ist.

4.1.7.4 Test der Antikörper

Erste Blutabnahme

Die Messung des Serums der ersten Blutung, welche einen Monat nach Beginn der Immunisierung durchgeführt wurde, ergab im Checkerboard bei allen Kombinationen von AK und Tracer zwischen 1:5000 und 1:40.000 weder einen Gradienten, noch sonst eine erkennbare Farbentwicklung. Auch ein Test bei einer AK-Verdünnung von 1:20.000 und getesteten Tracerverdünnungen von 1:5.000 bis 1:40.000 ergab keine Farbe. Da es sein kann, dass der Titer des Serums nach der kurzen Zeit der Immunisierung noch sehr niedrig war,

⁵² Proteingehalt im Edukt Im gemessenen Edukt waren keine Spuren von SMX enthalten, da hier nur die KLH-Lösung (mit DMF versetzt) gemessen worden war. Somit bedürfen die gemessenen 3,9 mg/mL keiner Korrektur.

wurde die Antikörperkonzentration stark erhöht und Tests mit Serumverdünnungen von 1:1.000 und 1:100, bei Tracerverdünnungen von 1:4.000 bis 1:32.000 durchgeführt. Auch dabei war mit diesem ersten Serum immer noch keine spezifische Bindung zu sehen.

Zweite Blutabnahme

Zwei Monate nach Beginn der Immunisierung wurde wieder Serum vom Kaninchen entnommen und erneut mittels Checkerboard getestet. Gleichzeitig wurde ein Test mit einer Antikörperverdünnung von 1:20.000, sowie Tracerverdünnungen von 1:5.000 bis 1:40.000, durchgeführt. Mithilfe des Testes konnten diesmal Kurven erhalten werden, wodurch nachgewiesen wurde, dass im Serum nun nach zwei Monaten spezifische SMX-Antikörper vorlagen und durch Konkurrenz der Standards mit dem Tracer um die spezifischen Bindungsstellen Standardkurven erhalten werden können. Der A-Wert betrug bei der geringsten Tracerverdünnung 0,3, der C-Wert 1,884 $\mu\text{g/L}$. Sogar bei der Tracer-Verdünnung von 1:40.000 war noch eine Kurve zu berechnen, deren A-Wert aber unter 0,1 lag (siehe Abb. 33).

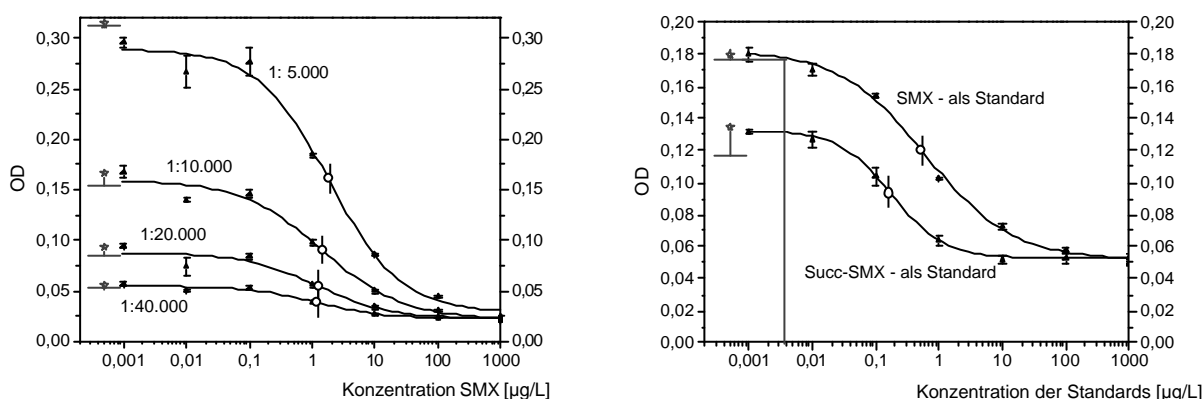


Abbildung 33: *Test des SMX-Antikörpers mit verschiedenen Tracerkonzentrationen (Serumverdünnung 1:20.000, Volumina, Inkubations- und Entwicklungszeiten gemäß Kap. 3.2.7.1); Bestimmung der Kreuzreaktivität des Antikörpers gegen Succ-SMX (Serumverdünnung 1:10.000, Tracerverdünnung 1:10.000); Beispielhafte Ermittlung der Nachweisgrenze ausgehend von der S_D des Blanks; Angabe der Testmittelpunkte als Kreis mit Längsstrich, Zeichnung der Blanks mit dreifacher Standardabweichung als grauer Stern mit grauem Balken*

Die Nachweisgrenze eines ELISA-Tests kann auf verschiedene Weisen berechnet werden (siehe Kap. 3.2.7.2). Zum einen kann sie als X-Wert des Blanks abzüglich der dreifachen Standardabweichung berechnet oder am Graphen abgelesen werden. Dieses Verfahren führt allerdings dann zu Schwierigkeiten, wenn der Y-Wert (nach Abzug von $3 \times SD$) über der Kurve liegt und deshalb kein Wert auf die X-Achse abgebildet werden kann. Man sieht in Abb. 33, dass dies bei zwei Kurven der Fall ist, weshalb eher eine Bestimmungsgrenze anzugeben ist, die als C-Wert abzüglich einer Zehnerpotenz definiert werden kann.

Die Auswertung des Checkerboards zeigte die höchsten Extinktionswerte erwartungsgemäß bei den Kombinationen der höchsten Konzentrationsstufen. Diese lagen bei 0,6 Einheiten OD. Den niedrigsten Wert zeigt die Kombination 1:40.000 mit 1:40.000 mit 0,04. Zwischen den AK-Verdünnungen 1:5.000 und 1:10.000 bestanden bei allen Kombinationen des Tracers mit diesen kaum Unterschiede (siehe Abb. 9). Tendenziell brachte die 1:10.000 Verdünnung sogar etwas höhere Werte. Mit einem OD-Wert von 0,35 sollte eine AK-Verdünnung von 1:10.000 mit einer Tracer-Verdünnung von 1:10.000 einen genügenden A-Wert ergeben mit gleichzeitig gutem Testmittelpunkt. Mit dieser Kombination wurde die Kreuzreaktivität des SMX-Antikörpers gegen andere Sulfonamide getestet.

Im praktischen Test ergab diese Kombination einen A-Wert von 0,18 und einen C-Wert von 0,62 $\mu\text{g/L}$ (siehe Abb. 33). Die optische Dichte im Test war zwar geringer als beim Checkerboard, dies lag aber zum einen an dem Testverfahren selbst, in welchem eine Konkurrenzsituation besteht und daher andere Bedingungen herrschen und zum anderen daran, dass die Platte des Checkerboard einen Tag vor dem Test beschichtet wurde, während die Platte zum Test der Kreuzreaktivität zwei Tage zuvor gecoatet wurde und daher eine gewisse Beeinflussung des Antikörpers (wg. Lagerstabilität) stattgefunden haben kann.

Die Ermittlung der Nachweisgrenze brachte beim Verfahren des Blanks minus dreifacher Standardabweichung eine Konzentration von ca. 40 ng/L. Ausgehend von der Konzentration am Testmittelpunkt, sind bei einer Zehnerpotenz darunter Messungen mindestens ab 60 ng/l in der Messlösung möglich.

Im Test der Kreuzreaktivität wurden Sulfamethoxazol, Sulfadimidin, Sulfadiazin und das Zwischenprodukt Succinamyl-Sulfamethoxazol überprüft. Dabei zeigte sich, dass der SMX-Antikörper keinerlei Kreuzreaktivität gegenüber Sulfadimidin und gegenüber Sulfadiazin zeigt. Es findet keine spezifische Bindung statt und es können keine Kurven erhalten werden. Somit beträgt die Kreuzreaktivität zu diesen 0 %. Die Erkennung von Succ-SMX ist hingegen

sehr gut. Der Testmittelpunkt beträgt mit $0,18 \mu\text{g/L}$ ($= 0,51 \text{ nmol/L}$) etwa ein Fünftel des C-Wertes von SMX ($2,45 \text{ nmol/L}$). Somit würde die Kreuzreaktivität 481 % (molar berechnet) betragen. Da die Reinheit von Succ-SMX aber nicht genau bekannt ist und außerdem noch Spuren von SMX darin enthalten waren, kann dieser Wert also nicht allgemein auf Succ-SMX übertragen werden, sondern gilt nur für die hier verwendete Substanz. Allerdings ist die spezifische Bindung eines solchen Derivates üblicherweise etwas besser als die der Primärsubstanz, da das Derivat dem Immunogen noch ähnlicher ist, als das Hapten [173]. Daher werden im Serum auch Antikörper gegen Teil-Strukturen des Haptens mit gebundenem Spacer vorliegen, also gegen die Ansatzstelle von Bernsteinsäure am Sulfamethoxazol. Solche Antikörper können sehr gut das Zwischenprodukt binden, weniger gut aber den Analyten selbst. Folglich sollten also auch solche Metabolite von SMX erkannt werden, die an der para-Aminogruppe ähnlich verändert sind.

Insgesamt hat die Immunisierung mit dem selbst synthetisierten Sulfamethoxazol-KLH Konjugat ein Serum ergeben, welches schon nach zwei Monaten Antikörper enthält, die sehr spezifisch gegen Sulfamethoxazol sind. Mit einer Kreuzreaktivität von 0 % gegenüber anderen getesteten Sulfonamiden kann hiermit ein ELISA-Testformat durchgeführt werden, welches die alleinige Bestimmung von Sulfamethoxazol in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich erlaubt. Bei Verwendung einer Serumverdünnung von 1:10.000 und einer Tracerverdünnung von 1:10.000 ist eine Bestimmung im unteren ng/L-Bereich und über zwei Zehnerpotenzen möglich. Mit einer weiteren Verdünnung von Antikörper oder Tracer wäre auch ein noch niedrigerer Testmittelpunkt zu erreichen, welcher aber zu Lasten der Signalintensität ginge. Daher wurde für die Messung von Proben ebenfalls die 1:10.000 Verdünnung des Antikörpers und die 1:10.000 Verdünnung des Tracers⁵³ verwandt. Die niedrige Nachweisgrenze erlaubt dabei die direkte Messung von Oberflächenwasserproben ohne Aufkonzentrierungsschritt, sofern die Konzentrationen mindestens im zweistelligen ng/L-Bereich liegen. Bei Abwasserproben mit höheren Konzentrationen wird eine Messung ebenfalls möglich sein, sofern durch einen Verdünnungsschritt die Matrixbelastung soweit gesenkt wird, dass sie die spezifische Erkennung nicht beeinflusst.

⁵³ Tracerverdünnung

Eigentlich ist die Tracerverdünnung bei 1:10.000 eine 20.000fache Verdünnung, da nach Synthese und Reinigung des Tracers schon eine 1:1 Verdünnung mit Glycerol vorgenommen wurde.

Fazit der ELISA-Testentwicklung

Es konnte ausgehend von der Synthese des Immunogens, der Testung der Zwischenprodukte, der Synthese eines Tracers und der Immunisierung zur Antikörpergewinnung ein kompletter Sulfamethoxazol-Enzymimmunoassay mit hoher Spezifität und niedriger Nachweisgrenze entwickelt werden, der ein einfach durchführbares Verfahren zur Bestimmung von Sulfamethoxazol in verschiedenen Matrices erlaubt.

4.2 Ergebnisse der Probenmessungen

4.2.1 Gülle- und Bodenproben

4.2.1.1 Betrieb 1

Gülle

Die Messung des Gülleextraktes per ELISA auf Sulfadimidin ergab einen Gehalt von $1,24 \pm 0,07$ mg/L.

Nach Auskunft des Züchters wurde das Mittel Sulfadimidin-haltige Mittel Vetoprim[®] 24% zur Behandlung seiner Tiere bei Durchfallerkrankungen oder bei Darminfektionen eingesetzt. Dabei erfolgt eine Dosierung gemäß der Gebrauchsinformation [186] von 1 mL der 100 mg/mL-Lösung je 10-15 kg Körpergewicht. Somit werden bei der therapeutischen Behandlung nur 6-10 mg/kg KG dieses Mittels täglich eingesetzt, im Gegensatz zu anderen üblichen Dosierungen von Sulfadimidin von 50-100 mg/kg KGW/d (siehe Kap. 2.7.2.1). Daher erfordert die Behandlung einer Zuchtsau von 120 kg also nur 720-1200 mg SDM pro Tag und Tier. Dies ergäbe eine Konzentration in den Ausscheidungen (ca. 12 kg insgesamt täglich) von 60-100 mg/kg. Wie in Kap. 2.7.2.2 erklärt, resultieren unter Berücksichtigung der Verdünnung mit nicht-kontaminierten Einzelausscheidungen (durchschnittliche Behandlung von 2 % der Tiere), einer gewissen Verdünnung von 50-100 % aus Reinigungswasser, und der Möglichkeit der Rückbildung der Ausgangssubstanz aus den Metaboliten, hier aus 100 mg/kg in einer Einzelausscheidung anschließend deutlich verringerte Konzentrationen von etwa 1 mg/kg.

Häufig ist es aber so, dass durch Ansteckung gleichzeitig mehrere Tiere behandelt werden (also nicht nur eines von 50), so dass die Konzentrationen in einer Tagesmischgülle weit höher liegen können, zu Zeiten jedoch, in denen eine zu behandelnde Krankheit nicht auftritt, auch deutlich darunter oder bei Null liegen können. Somit ist die Annahme, dass immer 2 % der Tiere behandelt werden, im zeitlichen Mittel zu verstehen. Da die Gülle in den Betrieben aber über eine gewisse Zeitspanne bis zur Ausbringung gesammelt wird, findet sich hier auch die kalkulierte mittlere Konzentration wieder. Eine höhere würde z.B. auftreten, wenn der Gülletank geleert worden ist und dann relativ viele Tiere behandelt werden.

Boden

Der ebenfalls untersuchte Boden, auf den eine Gülle der gleichen Herkunft acht Monate zuvor zur Düngung ausgebracht worden war, hatte eine Trockenmasse von 75,0 % und eine Dichte (im feuchten Zustand) von $1,74 \text{ g/cm}^3$. Die Untersuchung auf Sulfadimidin ergab Gehalte im $\mu\text{g/kg}$ -Bereich. Extrakte des feuchten Bodens enthielten $14,0 \pm 0,3 \text{ } \mu\text{g/kg}$ bezogen auf die Trockenmasse (ähnliche Werte fanden auch Höper et al., siehe Einleitung Kap. 2.7.2.3), Extrakte des getrockneten Bodens $16,8 \pm 0,8 \text{ } \mu\text{g/kg}$ ⁵⁴ (siehe Tab. 25).

Diese Gehalte waren also noch acht Monate nach der Ausbringung von Gülle aus dem Boden extrahierbar. Berücksichtigt man zusätzlich einen Anteil, der zwar nicht abgebaut war, der aber mit der Methode nicht extrahierbar war, so befanden in dem Boden evtl. sogar noch höhere Gehalte. Die auf den Boden zu Düngezwecken verwendete Gülle entstammte dem gleichen Betrieb und enthielt wahrscheinlich ebenfalls ähnliche Gehalte an SDM, wie sie in der aktuelleren Charge gefunden wurden, da sich die Verschreibungspraxis laut Auskunft des Betriebsinhabers im letzten Jahr nicht geändert hatte. Werden bis zu 4 L/m^2 dieser Gülle bei einmaliger Düngung im Jahr ausgebracht, so sind dies bis zu 5 mg SDM . Andere Studien, in denen mit Gülle behandelte Böden auf ihre Gehalte an Tetracyclinen untersucht worden sind, ergaben, dass Rückstände nur in den obersten 30 cm und nicht darunter gefunden werden konnten (siehe Kap. 2.7.2.3 und Berechnung in Kap. 2.8.2). Wenn sich die 5 mg also nur in den obersten 30 cm des Quadratmeters befinden, so liegen sie in 300 L Boden vor. Bei einer Dichte von $1,74 \text{ g/cm}^3$, wären das ca. 500 kg feuchter Boden, was eine Konzentration von etwa $10 \text{ } \mu\text{g/kg}$, bzw. $13 \text{ } \mu\text{g/kg}$ Trockenboden ergäbe. Allerdings werden Sulfonamide deutlich mobiler als Tetracycline angesehen, was anhand der $K_{d,\text{Boden}}$ -Werte verglichen werden kann. Tetracycline gelten laut Tolls [131] als immobil, Sulfadimidin dagegen als stark mobil. Somit müsste sich SDM (unter Berücksichtigung, dass die ausgebrachte Gülle nicht deutlich mehr an SDM enthielt als aktuell) also eigentlich auch in tiefere Bodenschichten verlagern können und somit ein deutlich größeres Volumen als 300 L penetrieren, wodurch folglich geringere Konzentrationen in der untersuchten Bodenschicht resultieren müssten (oberste 0-15 cm, Pflugtiefe ist zu berücksichtigen). Dass nun dennoch ca. $14\text{-}17 \text{ } \mu\text{g/kg}$ gefunden werden konnten und in den sieben Monaten sicherlich ein gewisser Abbau stattgefunden hat, und nicht sämtliche Substanz extrahiert werden konnte, deutet auf Folgendes hin:

54

Eingerechnet ist die Wiederfindungsrate gem. Kap. 4.1.4.3 zur Berücksichtigung von Matrixeffekten bei der ELISA-Messung, nicht aber die Extraktionsausbeute gem. Kap. 4.1.5, da die Vergleichbarkeit der Wiederfindung bei Extraktionen unterschiedlicher Bodenarten (Zusammensetzung, org. Kohlenstoffanteil) und unterschiedlich gealterter und bewirtschafteter Böden nicht gegeben ist.

- entweder die ausgebrachte Gülle enthielt im vorherigen Frühjahr deutlich höhere Gehalte,
- oder die Mobilität von SDM ist in diesem Boden nicht so stark, wie theoretisch angenommen, so dass SDM tatsächlich nur in der oberen Schicht verbleibt und kaum ausgewaschen wird,
- oder die Substanz ist relativ stabil, so dass auch Gehalte aus früheren Gülleausbringungen zu den gefundenen Konzentrationen beitragen und die Werte sich mit der Zeit erhöhen.

4.2.1.2 Betrieb 2

In der Rindergülleprobe war kein SDM nachweisbar (BG des ELISA-Verfahrens, bei 1/10 des C-Wertes = 0,16 µg/L, BG bei X-Wert des Blanks - 3 x SD = 0,30 µg/L). Da über die Verwendung von Antibiotika in diesem Betrieb vom Niederrhein nichts bekannt war, kann der negative Nachweis daran liegen, dass hier tatsächlich keine Sulfadimidin-haltigen Medikamente eingesetzt wurden.

4.2.1.3 Betrieb 3

ELISA-Messung - Gülle

In der Rindergülle aus Mai 2002 war Sulfadimidin nicht nachweisbar (gleiche BG, wie in 4.2.1.2 angegeben). Die Schweinegülle aus Mai 2002 enthielt $1,04 \pm 0,22$ mg/L, also ähnlich viel, wie die Probe von Betrieb 1 aus Ostwestfalen (siehe Tab. 25).

Tabelle 25: *Gehalte von Sulfadimidin in verschiedenen Güllen und in damit beaufschlagtem Boden [mg/L bzw. µg/kg TS]*

Betrieb	Probenart	Herkunft	Sulfadimidin-Gehalt [mg/L]*
B 1	Schweinegülle	Ostwestfalen	$1,24 \pm 0,07$
B 2	Rindergülle	Niederrhein	n.n.
B 3	Schweinegülle	Gut Frankenforst	$1,04 \pm 0,22$
B 3	Rindergülle	Gut Frankenforst	n.n.
B 1	Boden mit Gülle von Betrieb 1 behandelt	Ostwestfalen	$14,0 \pm 0,3$ µg/kg $16,8 \pm 0,8$ µg/kg

* Standardabweichung aus Dreifachbestimmung per ELISA

Damit lagen hier die Gehalte in der Gülle von Betrieb 3 ebenfalls in dem kalkulierten Bereich. Ähnliche Werte fanden Hamscher et al. und waren auch im BLAC-Programm gemessen worden, siehe Einleitung Kap. 2.7.2.2.

In jeder der Rinder- und Schweinegülleproben aus Januar 2003 ließen sich Gehalte an Sulfadimidin messen (Bestimmungsgrenze des ELISA-Verfahrens bei 1/10 des C-Wertes = 0,093 µg/L, BG bei X-Wert des Blanks - 3 x SD = 0,057 µg/L).

Diese reichen von 0,25 mg/L für das Jauchewasser, bis zu 18,7 mg/L für die frische Schweinegülle. Den zweithöchsten Gehalt wies die ältere Schweinegülle mit 0,76 mg/L auf (siehe Tab. 26). In den Güllebehälter aus dem die frische Schweinegülle stammte, wurden die täglichen Ausscheidungen aus den Schweineställen eingeleitet. Der Behälter mit der älteren Schweinegülle war schon etwas länger gelagert und enthielt keine aktuellen Ausscheidungen.

Tabelle 26: *Gehalte von Sulfadimidin in verschiedenen Güllen und in damit beaufschlagtem Boden [mg/L bzw. µg/kg]*

Betrieb	Probenart	Herkunft	Sulfadimidin-Gehalt [mg/L] *
B 3	Rindergülle	Gut Frankenforst	0,31 ± 0,09
B 3	Mischgülle	Gut Frankenforst	0,36 ± 0,10
B 3	Jauchewasser	Gut Frankenforst	0,25 ± 0,07
B 3	Schweinegülle (frisch)	Gut Frankenforst	18,7 ± 3,6
B 3	Schweinegülle (alt)	Gut Frankenforst	0,76 ± 0,15
B 4	Rindergülle	Erftkreis	0,22 ± 0,05
B 3	Boden von B 3, behandelt mit Schweinegülle von B 3	Gut Frankenforst	n.n.
B 3	Boden von B 3, behandelt mit Rindergülle von B 3	Gut Frankenforst	0,70 µg/kg bzw. 1,17 µg/kg TM
B 4	Boden von B 4, behandelt mit Rindergülle von B 4	Erftkreis	0,67 µg/kg bzw. 0,83 µg/kg TM ⁵⁵

* Standardabweichung aus Sechsfachbestimmung per ELISA

ELISA-Messung - Boden

Der Boden, der stets mit Rindergülle gedüngt worden war, lieferte hier zwar mitunter auch gewisse Messwerte, diese lagen jedoch im Bereich der Bestimmungsgrenze, so dass zwar gesagt werden kann, dass in dem Frankenforster Boden SDM enthalten war, eine genaue Angabe des Wertes aber schwierig ist, da die Quantifizierung in diesem Bereich mit einem gewissen Fehler behaftet ist. In dem Boden, auf den Schweinegülle ausgebracht worden war, waren keine Gehalte an Sulfadimidin nachweisbar.

HPLC-Messung von Gülle- und Bodenextrakten

Die HPLC-Messungen waren aufgrund der Matrix nur sehr schwierig zu quantifizieren und erfolgten ohne Berücksichtigung von Wiederfindungsraten, zumal sich die Proben in ihrer Herkunft, Art, Konsistenz, Bodentyp deutlich unterschieden.

Trotz der Probleme bei der UV-Messung (Beeinflussung der Basislinie durch die Matrix) war es möglich, die per ELISA gefundenen SDM-Konzentrationen in ihren Bereichen zu bestätigen. Des Weiteren konnte ein Gehalt an Amoxicillin in den beiden Schweinegülleproben erkannt werden. Nach dieser Abschätzung waren in der frischen Schweinegülle 3,7 mg/L und in der älteren 3,8 mg/L enthalten. Laut Auskunft der Leitung des Bereichs Sauenzucht des Gutes Frankenforst, wird Amoxicillin in dem Betrieb häufig angewendet (z.B. als prophylaktische Gabe für Ferkel). Von anderen Antibiotika, die laut Auskunft ebenfalls gelegentlich gegeben werden, konnte nur Enrofloxacin erkannt, aber nicht quantifiziert werden. Weitere, wie Phenoxymethylpenicillin oder Tetracyclin, konnten hingegen nicht gefunden werden.

Auch per HPLC-UV waren in dem Boden, auf den Schweinegülle ausgebracht worden war, die von den hier untersuchten Güllen die höchsten Gehalte an SDM aufwies, keine Gehalte zu finden. Dies könnte einerseits daran liegen, dass in der letztmalig aufgebrauchten Gülle aufgrund einer möglicherweise nur selten erfolgten Anwendung nur sehr geringe Konzentrationen von SDM-Rückständen vorlagen. Andererseits kann es aber auch sein, dass die Bodenart dergestalt ist, dass entweder Sulfonamide nur sehr schlecht adsorbieren und daher leicht ausgewaschen werden können, oder aber durch Bodenmikroorganismen sehr leicht abgebaut werden können. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Probenahme nicht repräsentativ war und nur Stellen erfasst worden sind, an denen keine Rückstände vorlagen.

4.2.1.4 Betrieb 4

Gülle

In der Rindergülle aus dem Erftkreis konnten bei gleicher Bestimmungsgrenze, wie in Kap. 4.2.1.3, 0,22 mg/L an Sulfadimidin gemessen werden. Damit wies sie ähnliche Gehalte auf, wie die Proben vom Gut Frankenforst (außer der frischen Schweinegülle) (siehe Tab. 26).

Boden

Die Lösung des Bodens, der mit einer Rindergülle, wie die oben beschriebene gedüngt worden war, lieferte im ELISA-Test Sulfadimidinkonzentrationen im Bereich der Bestimmungsgrenze. Ebenso wie in Kap. 4.2.1.3 kann daher zwar gesagt werden, dass in dem Boden SDM enthalten war, eine genaue Quantifizierung aber schwierig ist.

Dennoch ist zu vermuten, dass die Größenordnung von etwa 1 µg/kg in dem Boden (auch in dem Boden von Gut Frankenforst, Betrieb 3) passend ist, auch wenn die Gehalte in den Extrakten zur HPLC-Messung aufgrund der Matrix nur schwierig zu bestimmen waren und die Konzentrationen in den Lösungen zur ELISA-Messung zwischen den Bestimmungsgrenzen lagen. Wenn die Gehalte in den damals ausgebrachten Güllen ebenfalls im Bereich von 0,2-0,3 mg/L lagen, wie sie auch hier in den Güllen gemessen werden konnten, so kann in den Böden analog zur Abschätzung in Kap. 4.2.1.1 mit Gehalten im unteren µg/kg-Bereich gerechnet werden.

Fazit der Untersuchung von Gülle- und Bodenproben

Insgesamt betrachtet ist mit der Untersuchung verschiedener Güllen und damit beaufschlagter Flächen gezeigt worden, dass die Modellrechnungen (aus Kap.2.7.2.2 bzw. Kap. 2.8.2) für die Konzentrationen in Gülle und in Boden bestätigt werden konnten. Es konnten sowohl Rückstände in den Güllen im mg/L-Bereich, als auch in Böden im µg/kg-Bereich gefunden werden. Die höchsten Gehalte waren mit bis zu 19 mg/L in einer frischen Schweinegülle gemessen worden, was darauf schließen lässt, dass wohl ein recht hoher Prozentsatz der Tiere aktuell mit einem SDM-haltigen Mittel behandelt worden war. Mit dem Nachweis von SDM in Böden, auch mehrere Monate nach der Ausbringung von Gülle, konnte gezeigt werden, dass Sulfonamide nicht so leicht auswaschbar sind, wie möglicherweise angenommen, vielmehr, dass sie auch über lange Zeit im Boden erhalten bleiben und sich die

Konzentrationen mit der Zeit sogar erhöhen könnten. Des Weiteren zeigte der Nachweis im Boden, dass der Eintragspfad über die Gülleausbringung nachverfolgt werden konnte, in Bezug auf die qualitative und die quantitative Aussage (siehe Kap. 2.7.2). Durch die Gehalte in den unterschiedlichen Güllen konnte ferner die aktuelle Literatur bestätigt werden, in der verschiedene Antibiotika in Gülle ebenfalls in einem weiten mg/L-Bereich beschrieben worden sind.

4.2.2 Abwasser

4.2.2.1 Kläranlage 1 - Troisdorf

In Kapitel 2.8.1 wurde dargestellt, dass für SMX in Kläranlagenzuläufen eine Konzentration im Bereich von 1-2 µg/L als PEC berechnet werden kann. Alleine aufgrund der Höhe dieser zu erwartenden Konzentration, wäre daher eine direkte Messung des Abwassers per ELISA auf SMX möglich gewesen. Durch die Matrix jedoch, die besonders bei Zulaufproben ganz erheblich ist, kann der Test gravierend gestört werden, was durch die Hemmung des Enzyms oder die Blockierung der Antikörper bedingt sein kann.

In den unverdünnt gemessenen Proben war eine Bestimmung der SMX-Gehalte nicht möglich. Es waren Dotierungen hier in einem Bereich von 0,1 bis 0,9 µg/L in der Messlösung gewählt worden, was bei einer vermuteten Konzentration von 1 µg/L nur ein bis neun Zehntel des Gehaltes ausmacht. Diese Stufen waren zwar relativ niedrig im Vergleich zum Probengehalt, dennoch sollten sie sich im Test voneinander abgrenzen lassen.

Die Messungen zeigten allerdings keine Unterscheidung der einzelnen Dotierungsstufen. Mit gefundenen Konzentrationen auf allen Niveaus von etwa 100 µg/L konnte keine Gerade für das Standardadditionsverfahren angepasst werden. Die hier gemessenen unrealistischen Gehalte, von etwa 100 µg/L, zeigen allerdings, dass die unverdünnte Probe erhebliche Schwierigkeiten in der Bestimmung zeigt. Denn, dass eine solche Konzentration im Abwasser unmöglich ist, zeigen zum einen die Konzentrationen in den anderen Verdünnungsstufen, vor allem aber folgende Berechnung:

Von Sulfamethoxazol wurden im Jahr 2002 etwa 25 Mio. DDD verschrieben, was auch in den Jahren zuvor relativ konstant war und wohl auch aktuell recht ähnlich ist. Pro Tag macht das eine Anzahl von knapp 70.000 Tagesdosen aus. Da eine Tagesdosis von einer Person eingenommen wird, ist diese Zahl also gleichbedeutend mit der Anzahl an Personen, die pro

Tag SMX einnehmen. Über das ganze Jahr gemittelt, nehmen also etwa 70.000 Personen pro Tag Mittel mit diesem Wirkstoff ein, also bei einer Gesamtbevölkerung von ca. 80 Mio. eine Person von 1200. Zu gewissen Zeiten (z.B. Winter mit mehr Atemwegsinfektionen als im Sommer) werden es etwas mehr sein, und auch regionale Verschreibungspraktiken spielen möglicherweise eine Rolle.

An der Kläranlage Troisdorf sind 70.000 Einwohner angeschlossen, von denen pro Tag etwa 150 L Abwasser eingehen. Eine Konzentration wie die unverdünnt gemessenen 100 µg/L bedeutete also, dass an einem Tag 1050 g SMX die Kläranlage erreichen würden. Das bedeutete einen durchschnittlichen Eintrag pro Person und Tag von 15 mg, den Abbau im Körper mitgerechnet sogar von 75 mg. Um diese Zahl zu erreichen, müsste bei einer Tagesdosis von 1600 mg zur Behandlung, also eine Person von 100 bzw. von 20 (Abbau berücksichtigt) an dem Probetag SMX eingenommen haben, was doch ein wenig unrealistisch erscheint und eine unverhältnismäßig kranke Bevölkerung bedeuten würde oder, dass die ansässigen Ärzte sehr einseitig verschreiben würden.

Die Probleme der direkten Messung erfordern also die Verdünnung der Proben. Mit den hier vorgenommenen, sollte erkannt werden, ab welchem Matrixanteil eine Störung des Tests nicht mehr zu bemerken ist. Dies kann einerseits an den Messwerten der verdünnten aber undotierten Proben erkannt werden, falls diese, wie bei der unverdünnten Probe unmöglich erscheinende Werte aufweisen, vor allem aber an den Wiederfindungsraten durch die Standardaddition. Bedingt durch den Matrixeinfluss kommt es zu starken Überbestimmungen, die sich auf jede einzelne Dotierung verstärkend auswirken. Dadurch hatte man bei der 10fachen Verdünnung immer noch Wiederfindungsraten von etwa 190 % (siehe Abb. 34). Auch der hierin gefundene Grundgehalt mit einer Abwasserkonzentration von etwa 5,9 µg/L (unter Berücksichtigung der WDF) aus der undotierten Messung, bzw. 5,3 µg/L aus dem Standardadditionsverfahren berechnet, scheint etwas hoch, liegt aber dennoch in einer real vorstellbaren Höhe. Validere Daten lassen sich eher aus den Proben erhalten, bei denen der Matrixeinfluss geringer ist und somit die WDF annähernd 100 % beträgt.

Bei einer 50fachen Verdünnung erhielt man eine Wiederfindung der Dotierungen von 93 % und hatte somit keine matrixbedingte Überbestimmung (siehe Abb. 34). Die Messung der undotierten Probe ergab dabei einen Messwert von 0,026 µg/L (Wiederfindungsrate mitberücksichtigt), welcher jedoch knapp unter der BG der ELISA-Messung von 0,03 µg/L (X-Wert des Blank - 3 x SD) lag. Aufgrund der Standardaddition ließ sich dennoch ein Grundgehalt der Probe ermitteln, der mit 0,024 µg/L etwa die gleiche Konzentration ergab.

Daraus konnte, unter Berücksichtigung der Verdünnung, ermittelt werden, dass in der Abwasserprobe eine Konzentration von 1,2 µg/L vorlag.

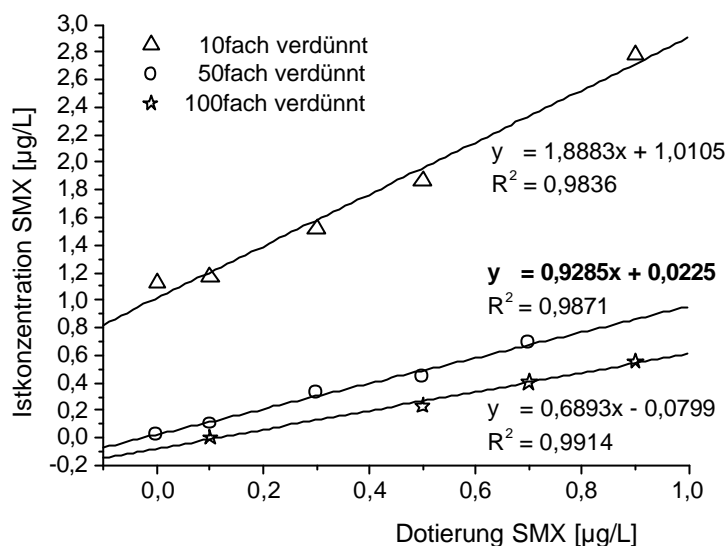


Abbildung 34: Messung von Kläranlagenzulaufproben; Einfluss der Verdünnung auf die Dotierungen und die Bestimmbarkeit

In der 100fachen Verdünnung war der Gehalt der undotierten Probe so gering, dass er nicht von der Blank-Probe unterschieden werden konnte. Die Standardaddition lieferte aufgrund der leicht unterschiedlichen Bestimmbarkeit auf den einzelnen Dotierungsstufen nur einen negativen y-Achsenabschnitt (wg. der Verdünnung wäre ohnehin nur mit einem sehr geringen Abschnitt zu rechnen gewesen), durch den ein Grundgehalt sich ebenfalls nicht quantifizieren ließ. Die WDF bei 100facher Verdünnung betrug 69 % und war damit etwas schlechter als bei 50facher Verdünnung.

Zur Quantifizierung ist daher das Standardadditionsverfahren einer 50fachen Verdünnung von Abwasser heranzuziehen. Es ließen sich damit SMX-Gehalte im Kläranlagenzulauf einer konventionellen Kläranlage im unteren µg/L-Bereich finden. Pro Tag entspricht dies bei 70.000 Einwohnern und 150 L Abwasseranteil/Person einer Fracht von ca. 13 g insgesamt bzw. 0,18 mg SMX/Person.

Den körpereigenen Abbau⁵⁶ und die DDD eingerechnet, ergibt sich daraus ein Medikationsstatus von 1 Person pro 1800; oder ca. 40 Personen, die im Einzugsbereich der Kläranlage Sulfamethoxazol-Präparate einnehmen⁵⁷.

4.2.2.2 Kläranlage 2 - Troisdorf-Altenrath

Die Abbauleistung einer solchen Pflanzenkläranlage (Beschreibung in Kap. 3.1.5.3) hängt von den Außentemperaturen, von der Bodenbesiedlung, sowie von dem Zustand der Bepflanzung ab. Zum Zeitpunkt der Probenahme (August 2003) mit vollem Schilfbestand und hohen Temperaturen sollte die Klärleistung daher höher sein, als beispielsweise im Winter. Durch die Zeit, die das Wasser zur Passage des Schilffeldes benötigt, sowie durch die teilweise Vermischung von Zulauf mit Ablauf sind direkte Vergleiche zwischen Zulauf- und Ablaufproben nicht möglich.

Bei der Untersuchung der Zulauf- und Ablaufproben (Kap. 3.2.11.2) konnten drei der neun Antibiotika bestimmt werden. Es waren Clindamycin, Erythromycin (nur im Ablauf) und Sulfamethoxazol zu finden.

Tabelle 27: *Antibiotikakonzentrationen in der Pflanzenkläranlage Troisdorf-Altenrath im August 2003 [ng/L]*

Probe	Ort	CLI	ERY	SMX
Zulauf	in Absatzbecken	10	n.n.	23
Ablauf	Becken in Anlage	44	9	50
Ablauf	Ablauf zum Vorfluter	54	10	40

Die Konzentrationen der gefundenen Substanzen lagen im zweistelligen ng/L-Bereich und damit weit unter den zu erwartenden Konzentrationen in Abwasser. Beim Zulauf spielte

⁵⁶ Da keine Metaboliten von Sulfamethoxazol zur Verfügung standen, konnte nicht bestimmt werden, inwiefern Metaboliten wie N-4-Acetyl-SMX im ELISA-Test miterfasst werden. Daher kann es sein, dass in dem bestimmten Gehalt, die Abbauprodukte mitenthalten sind und somit der Medikationsstatus geringer ist.

⁵⁷ Liegt eine Mischkanalisation vor, müssen Regenereignisse (lagen zum Probenahmezeitpunkt nicht vor) mitberücksichtigt werden, da dadurch die Konzentration des reinen häuslichen Abwassers verdünnt würde.

sicherlich die Tatsache mit, dass das verwendete Verfahren auf die Bestimmung von Antibiotika in Oberflächengewässern angelegt war und die mitextrahierte Matrix zu starken Problemen bei der massenspektrometrischen Bestimmung durch Ionenunterdrückung führte, weshalb hier besonders wenig gefunden wird. Zum Teil traf dies auch auf das Ablaufwasser zu. Zwar war das Verfahren auf Oberflächenwasser abgestimmt, aber in Kap. 4.1.3.1 konnte gezeigt werden, dass auch in Wasser, welches hoch mit Abwasser belastet war, die Ionenunterdrückung nicht stärker war, als in unbelastetem Wasser und nicht zu stärkeren Unterbestimmungen führte, weshalb eine ungestörte Messung von Ablaufproben möglich schien. Dennoch könnte das hier untersuchte Ablaufwasser einen gewissen Einfluss auf die MS-Messung haben, da es sich ja nicht um ein „normal“ geklärtes Wasser handelt, sondern um eine Art Filtrat vom Zulauf.

Allerdings handelt es sich bei der Kläranlage hier um einen ganz besonderen Fall. Da tatsächlich nur 150 Leute angeschlossen sind, müsste direkt zu erkennen sein, ob ein Einwohner aktuell Antibiotika nimmt. Würde jemand z.B. Sulfamethoxazol zu Hause einnehmen, so wäre mit 1600 mg an Eintrag pro Tag zu rechnen (bzw. 300 mg nach körpereigenem Abbau), was eine Konzentration von 70 bzw. 14 $\mu\text{g/L}$ ausmachen würde. Trotz einer Ionenunterdrückung würde ein solcher Gehalt im $\mu\text{g/L}$ -Bereich zu erkennen sein. Über das Zustandekommen dieser deutlich geringeren Gehalte kann folglich nur spekuliert werden. Z.B. Einnahme von Medikamenten zu Hause, aber Ausscheidung vorwiegend am Arbeitsplatz; Besuch von Personen, die Antibiotika einnehmen; Zeitpunkt der Probenahme gerade zur Zeit nach der letzten Einnahme; Eintrag durch Vermischung von älterem belasteten Absatzschlamm mit frischem Zulauf. In Bezug auf die Substanzen ERY und CLI könnten die geringen Gehalte durch Anwendung der äußerst gering dosierten Augenheilmittel oder durch nur geringflächig aufgetragene Antiaknemittel herrühren, bei deren Anwendung (siehe Kap. 2.5.1.4 und 2.5.1.5) nur wenige Milligramm pro Tag eingesetzt werden.

4.2.3 Oberflächenwasser

4.2.3.1 Substanz screening

Zur Untersuchung von Oberflächengewässern sollte zunächst ermittelt werden, welche Antibiotikagruppen zu den umweltrelevanten gehören; welche also nach Einnahme, Ausscheidung und Behandlung in Kläranlagen noch zu messbaren Gehalten in den Gewässern führen können. Anhand der Verbrauchsmengen, der Pharmakokinetik und der Kenntnis der Abbauprozesse ist zwar eine Voraussage der Umweltkonzentrationen durchaus möglich (siehe Kap. 2.8.1, 2.8.2), jedoch können diese PEC nicht die Einzelsituation im Gewässer wiedergeben, sondern stehen nur für gemittelte Durchschnittskonzentrationen.

Dazu wurden 40 Gewässerproben untersucht. Hierbei handelte es sich vorwiegend um Proben aus dem Großraum Köln-Bonn, die sowohl größere Ströme und Flüsse, wie Rhein, Sieg, Wupper und mittelgroße, wie Dhünn, Erft, Bröl, als auch kleine Bäche miterfassten. Sie entstammten aus dem Rhein-Sieg-Kreis, Erftkreis, Stadt Bonn, Stadt Köln, Kreis Euskirchen und der Stadt Leverkusen. Es wurden aber auch Gewässer aus Ostwestfalen (Kreis Höxter, Kreis Lippe, Kreis Paderborn) und vom Niederrhein (Kreis Kleve) untersucht.

Die Proben waren so gewählt, dass durch sie einerseits Ballungsgebiete mit starker anthropogener Beeinflussung der Gewässer, und andererseits ländliche Gebiete mit hohem Anteil an Landwirtschaft abgedeckt wurden. So sollte anhand der gefundenen Substanzen erkannt werden, ob es zu einem Eintrag von Veterinärpharmaka aus der üblichen landwirtschaftlichen Praxis der Gülleausbringung in Oberflächengewässer kommen kann. Entsprechend sollte erkannt werden, ob es in stark besiedelten Gebieten zu hohen Einträgen von Humanantibiotika kommt. Zunächst wurde daher das Hauptaugenmerk auf die verschiedenen Substanzen gelegt und die Konzentrationsspanne, in der sie auftraten.

Es zeigte sich, dass in jedem der Gewässer Antibiotika-Rückstände nachgewiesen werden konnten, wenn auch die Konzentrationen oftmals nahe der Bestimmungsgrenze lagen. Es gab also kein vollkommen unbelastetes Gewässer unter den hier untersuchten, wenn auch der Belastungszustand sehr stark von Gewässer zu Gewässer differiert. Antibiotika zählen also zu den Substanzen, die sehr weit in der aquatischen Umwelt verbreitet sind.

Zwischen den verschiedenen Antibiotikagruppen sind sehr große Unterschiede zu sehen. Manche werden so gut wie nie detektiert, wohingegen andere in nahezu jeder Probe zu finden sind:

a) Penicilline, Aminopenicilline

Von den zwölf Substanzen dieser Gruppe konnten in den 40 Screening-Proben nur fünf verschiedene gefunden werden; Amoxicillin (4 von 40 Proben; bis 6 ng/L), Ampicillin (1 Probe; 26 ng/L), Flucloxacillin (1 Probe; 7 ng/L), Mezlocillin (1 Probe; 5 ng/L), Piperacillin (6 Proben; bis 48 ng/L). Von diesen gefundenen waren gleichzeitig höchstens drei verschiedene in einer Probe zu finden (Wupper). Die Tatsache, dass die Konzentrationen nur sehr gering sind, und nur sieben der vierzig Gewässerproben Rückstände von β -Lactamantibiotika aufweisen, bestätigt die Aussage in Kap. 2.7.1.4, dass diese Substanzen in Abwässern sehr leicht abbaubar sind und daher in den Vorflutern kaum mehr etwas von ihnen zu finden ist.

Insgesamt gesehen, bleiben die Penicilline in ihrer Bedeutung in der aquatischen Umwelt hinter anderen Substanzen deutlich zurück, obwohl dies nicht ihrer Bedeutung in der Therapie, als weitaus am stärksten verschriebene Gruppe, gerecht wird. Anders sieht es hier sicher aus, wenn Metaboliten betrachtet würden, vor allem die geöffnete Ringform oder Ester der Substanzen, sofern das Aminopenicillansäuregrundgerüst (auch die geöffnete Form) im Kläranlagenprozess nicht noch weiter abgebaut wird. Da es sich aber bei diesem Grundgerüst um eine Form eines Dipeptids handelt [49], ist es wahrscheinlich, dass auch ein weiterer Abbau noch vonstatten gehen wird.

b) Tetracycline

Noch seltener als die Penicilline waren in den Screeningproben die vier Tetracycline zu finden. Von ihnen war lediglich in einer Probe (Rotbach im Erftkreis) Tetracyclin mit 13 ng/L zu finden.

Nachdem auch in den Untersuchungen mit dotiertem Boden (Kap. 4.1.5), in dem, trotz hoher Dotierungen (Konz. im Boden 20 mg/kg) nach einer gewissen Dauer der Alterung, keinerlei Tetracycline mehr gefunden werden konnten, ist es nicht überraschend, dass auch in den Gewässern Tetracyclinrückstände äußerst selten auftreten. Auch in anderen Studien, siehe Kap. 2.7.1.6 konnten Tetracycline in Oberflächengewässern fast nie gefunden werden, was vor allem an den substanzspezifischen Eigenschaften liegt (siehe Kap. 2.7.1.3), manchmal aber auch an den hohen Bestimmungsgrenzen der angewandten Verfahren.

Mit hier verwendeten Methode, konnte bei einer BG von 10 ng/L immerhin einmal Tetracyclin in vierzig Proben gefunden werden.

c) Fluorochinolone

Ciprofloxacin und Ofloxacin konnten gelegentlich, jedoch nur in niedrigen Konzentrationen, in den Proben gefunden werden. Auch hierbei lagen die Konzentrationen im unteren ng/L-Bereich. Ofloxacin konnte in sechs Proben bis 20 ng/L, Ciprofloxacin in zwei Proben, bis 9 ng/L gemessen werden.

Untersuchungen schweizerischer Oberflächengewässer bestätigen ebenfalls das seltene Auftreten von Fluorochinolonen. Dabei fanden sie ähnliche Gehalte, wie sie hier bestimmt wurden, nämlich zwischen 5 und 20 ng/L [152].

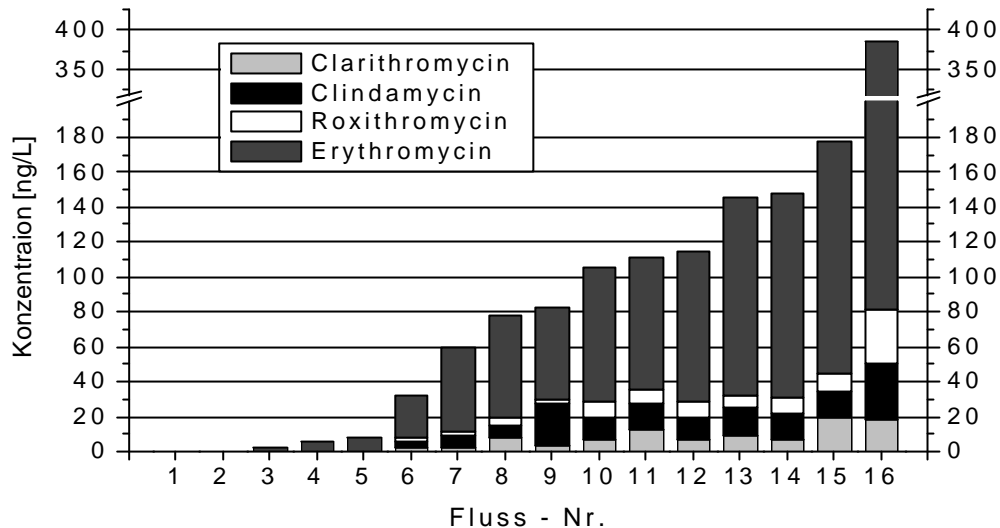
Die Begründung für das seltene Auftreten in geringen Konzentrationen ist auch bei den Fluorochinolonen in den Substanzeigenschaften und in ihrem Verhalten in Kläranlagenprozessen zu sehen (siehe Kap. 2.7.1.4), wodurch sie schon in Kläranlagenabläufen nur in geringen Konzentrationen vorhanden sind. Betrachtet man gefundene Konzentrationen in Abwässern von Ofloxacin und Ciprofloxacin im zweistelligen ng/L-Bereich, bis zu wenigen hundert ng/L (siehe Kap. 2.7.1.4), so liegen die hier in dieser Untersuchung gefundenen Gehalte von bis zu 20 ng/L in Oberflächengewässern im erwarteten Bereich, wenn man von einer weiteren Verdünnung des Abwassers des Faktors 10 ausgeht.

d) Lincosamide und Makrolide

Diese Gruppen wurden auf acht Vertreter untersucht. Relativ häufig konnten davon Clarithromycin (CLA), Clindamycin (CLI), Erythromycin (ERY) und Roxithromycin (ROX) gefunden werden. Sie waren in den meisten der Proben enthalten. Etwas seltener war Azithromycin zu finden (bis zu 13 ng/L), lediglich ein einziges Mal Tylosin mit 90 ng/L. Spiramycin (SPI, BG = 2 ng/L) und das Reserveantibiotikum Vancomycin (VAN, BG = 30 ng/L) waren in keiner der Proben nachweisbar. Allerdings sind auch die Einsatzmengen dieser Substanzen im Vergleich zu anderen Antibiotika äußerst gering (Jahr 2001, 300 kg für SPI, 1000 kg für VAN, zum Vergleich siehe Tab. 5).

Die Konzentrationen von CLI, CLA und ROX lagen zumeist zwischen 10 und 30 ng/L. Deutlich höhere Gehalte waren von Erythromycin mit bis zu 300 ng/L zu finden, meist über

50 ng/L. Von den insgesamt 40 Proben enthielten 35 messbare Gehalte an ERY, 29 an CLI, 27 an ROX, 26 an CLA.



- | | | | |
|------------------|------------------|-----------------------|----------------|
| 1. Ahrenbach | 5. Vilicher Bach | 9. Bröl | 13. Neffelbach |
| 2. Bruchbach | 6. Dhünn | 10. Sieg | 14. Agger |
| 3. Strunder Bach | 7. Rotbach | 11. Swistbach | 15. Erft |
| 4. Jungbach | 8. Rhein | 12. Siegl. Mühlgraben | 16. Wupper |

Abbildung 35: *Gehalte von Makroliden und Lincosamiden in Oberflächengewässern im Großraum Köln-Bonn [ng/L], Messung April 2002*

Man erkennt in Abb. 35, dass in nahezu jeder Probe Rückstände dieser Wirkstoffgruppe anzutreffen waren und die Summe der Gehalte an diesen vier Substanzen alleine schon 100 ng/L häufig überstieg. Mit Jahresaufwandmengen im Humanbereich von nahezu 10.000 kg (bei ERY mehr) (siehe [85], eigene Berechnungen, Tab. 6) werden diese Substanzen zwar in geringerem Maße angewandt, als manche β -Lactamantibiotika oder Sulfonamide, aber auch noch relativ häufig. Sind sie dazu noch schwach abbaubar, gut wasserlöslich oder können Kläranlagenprozesse leicht ungestört überstehen, so ist der Eintrag und der Nachweis in Oberflächengewässern leicht nachvollziehbar. Andere Untersuchungen von Oberflächengewässern und Kläranlagenwässern (siehe Kap. 2.7.1.4) zeigten ebenfalls, wie auch in den hier beprobten Oberflächengewässern, dass die Konzentrationen von Erythromycin in Deutschland meist deutlich über denen der anderen Makrolide liegen, was auf die höheren Aufwandmengen von ERY zurückzuführen ist.

Verglichen mit den PEC Werten für Oberflächenwasser, konnten die bilanzierten Werte gut analytisch bestätigt werden. Als PEC war für ERY etwa 100 ng/L, für CLI ca. 25 ng/L (siehe Tab. 7) berechnet worden; also Konzentrationen, die in einigen der Gewässer auch tatsächlich so vorgefunden wurden.

Zu dem Befund von Tylosin, welches in einer einzigen Probe nachgewiesen werden konnte, ist zu sagen, dass Tylosin ein reines Veterinärantibiotikum darstellt. Es wird nicht im Humanbereich verwendet, weshalb es auch in Kläranlagenwässern bisher nicht gefunden werden konnte. Im Rotbach (Erftkreis) lag der Gehalt im Dezember 2001 bei 91 ng/L. Bis 1999 war Tylosin ein zugelassener Leistungsförderer. Seitdem ist seine Verwendung auf die Therapie und Prophylaxe bei Tieren beschränkt. Der Nachweis dieser Substanz zeigt eindeutig, dass es zu einem Eintrag von Veterinärantibiotika in Oberflächengewässer tatsächlich kommen kann. Dieser Eintrag kann bezogen auf Tylosin aufgrund dieses Einzelbefundes aber nur als gering eingestuft werden.

e) Sulfonamide und Trimethoprim

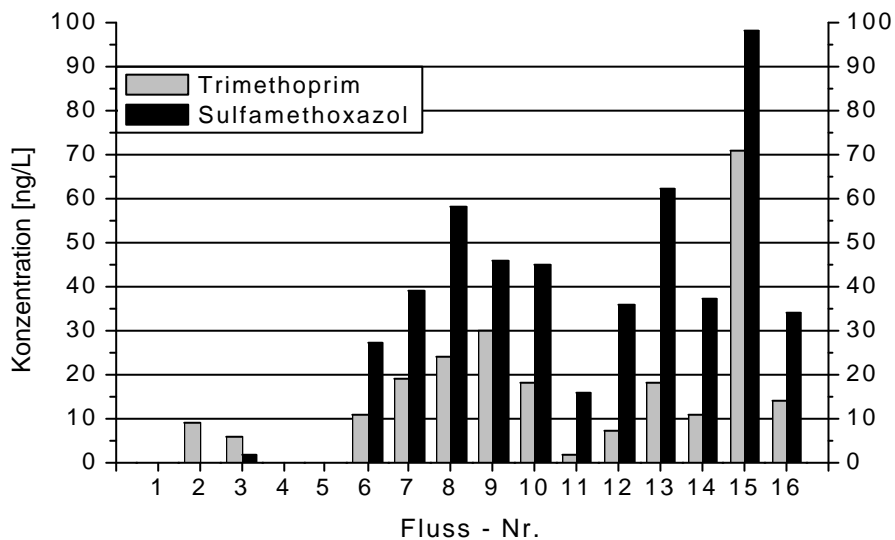
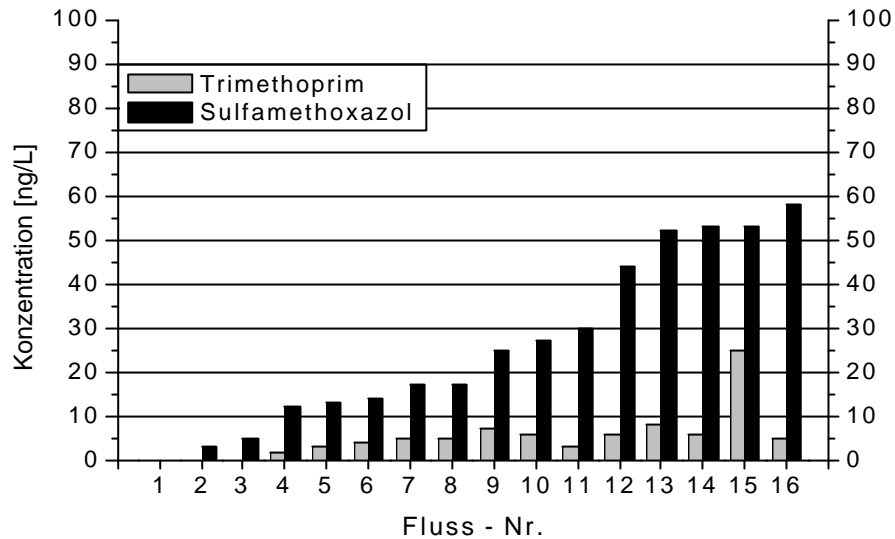
Die häufig in der Humanmedizin eingesetzten Antibiotika Sulfamethoxazol und Trimethoprim waren ebenso, wie Erythromycin und andere Makrolide in den meisten der Proben zu finden. Von vierzig Proben wiesen 34 Rückstände an SMX und 30 an TRI auf. Die Konzentrationen von SMX reichten dabei von Werten nahe der Bestimmungsgrenze (2 ng/L) bis zu 98 ng/L, oftmals 40-60 ng/L; von Trimethoprim lagen sie meist um 10 ng/L, bis zu 71 ng/L. Dabei war festzustellen, dass die beiden Substanzen zumeist in den selben Proben gleichzeitig auftreten. Verglichen mit den PEC-Werten in Oberflächenwasser bestätigen diese Ergebnisse recht gut die Berechnungen, die SMX in Konzentrationen von etwa 100 ng/L und TRI von etwa 45 ng/L sahen, wenn auch die gefundenen Konzentrationen leicht darunter lagen. Dass diese Substanzen auch in den Gewässern fast immer zusammen auftauchen, liegt daran, dass sie auch in den pharmazeutischen Mitteln zur Humanbehandlung immer zusammen eingesetzt werden⁵⁸.

In vergleichbaren Studien lagen die Gehalte von SMX und TRI in Oberflächengewässern ebenfalls in dem beobachteten Bereich, manchmal aber auch darüber (siehe Kap. 2.7.1.6).

⁵⁸

Trimethoprim wird z.T. auch alleine oder in Kombination mit anderen Sulfonamiden eingesetzt, wobei die Aufwandmengen dieser Mittel allerdings im Vergleich zur Formulierung „Cotrimoxazol[®]“ zu vernachlässigen sind.

Dabei war, wie auch hier (siehe Abb. 36), festzustellen, dass die Konzentrationen von Sulfamethoxazol nahezu immer höher lagen als die von Trimethoprim.



- | | | | |
|------------------|------------------|-----------------------|----------------|
| 1. Jungbach | 5. Vilicher Bach | 9. Agger | 13. Erft |
| 2. Strunder Bach | 6. Dhünn | 10. Siegl. Mühlgraben | 14. Swist |
| 3. Ahrenbach | 7. Sieg | 11. Rotbach | 15. Wupper |
| 4. Bruchbach | 8. Bröl | 12. Rhein | 16. Neffelbach |

Abbildung 36: Darstellung des Verhältnisses von Sulfamethoxazol zu Trimethoprim in Oberflächengewässern im Großraum Köln-Bonn, Konzentrationen [ng/L] im November 2001 (oben) und April 2002 (unten)

Trotz der unterschiedlichen Abbauraten im Körper und im Kläranlagenprozess kann somit das Verhältnis, welches in den Arzneimitteln vorliegt (SMX:TRI, 5:1), in der Tendenz auch noch in den Oberflächengewässern erkannt werden. Berechnungen dazu stellte auch eine Studie zur Grundwasserbelastung in Baden-Württemberg an [133], die ein solches Verhältnis ebenfalls in den Oberflächengewässern, nicht aber mehr im Grundwasser feststellten, da TRI wohl aufgrund seines unterschiedlichen Sorptionsverhaltens dort nicht mehr ankommt. Die Gehalte in den Gewässern wurden in der gleichen Größe wie hier im Großraum Köln-Bonn bestimmt (SMX 25-163 ng/L, TRI 7-24 ng/L).

Sulfadimidin wird in Deutschland ausschließlich als reines Veterinärantibiotikum verwendet. Sollten Gehalte davon in Oberflächengewässern zu finden sein, so ist dies eine Bestätigung für den Eintrag von Veterinärpharmaka und somit, als wahrscheinlichste Ursache, für einen Eintrag aus der Landwirtschaft. Denkbar und in Kap. 2.7.2.5 angesprochen ist zwar auch ein Eintrag von Veterinärpharmaka aus dem Klein- und Haustierbereich in Abwässer und damit über den Pfad der Kläranlagen möglich (durch Abschwemmung von Ausscheidungen von versiegelten Flächen in die Kanalisation oder durch die Anwendungspraktiken in Tierpraxen), doch dürfte dieser in der Bedeutung eher hinter einem möglichen Eintrag aus der Landwirtschaft, mit den Verfahren der Gülleausbringung und der Mobilität von Substanzen nach Regenereignissen, zurückstehen.

Von den vierzig Proben konnten in sechs Rückstände von Sulfadimidin nachgewiesen werden. Diese lagen im unteren ng/L-Bereich nahe der Bestimmungsgrenze, bis zu 7 ng/L. Nachdem also Sulfadimidin-Rückstände sowohl in Gülle-, als auch in Bodenproben nachgewiesen werden konnten, ist nun bewiesen, dass solche Stoffe auch die Oberflächengewässer erreichen können. Auch in einer anderen Untersuchung konnten reine Veterinärantibiotika in Oberflächengewässern gefunden werden (siehe Kap. 2.7.2.4). Allerdings waren dabei in Proben von Oberflächengewässern mit einem hohen Anteil an kommunalem Abwasser keinerlei Gehalte zu finden, was dafür spricht, dass Gehalte, so sie denn auftreten, nicht über den Abwasserpfad, sondern über den Pfad der Landwirtschaft eingetragen werden. Gleichwohl wurden in der BLAC-Studie auch in manchen Abwasserproben schon SDM-Gehalte gefunden [85].

In den sechs Gewässern, die SDM-Rückstände enthalten, sind zwar ebenfalls Humanantibiotika enthalten, was also darauf hindeutet, dass sie durch kommunale Abwässer beeinflusst sind, jedoch sind dies nicht gerade Gewässer, die die höchsten Human-

Antibiotikagehalte aufweisen, sondern nur durchschnittliche Gehalte haben. Außerdem kann auch bei anthropogen beeinflussten Gewässern zusätzlich, bedingt durch die Einzugsgebiete der Fließgewässer, durchaus ein Einfluss von landwirtschaftlich geprägten Regionen ausgehen.

f) Diversität der Flüsse

Betrachtet man die verschiedenen Flüsse, so zeigt sich zunächst ein recht uneinheitliches Bild. Die Flüsse, die die größte Auswahl an Substanzen enthielten, bzw. die die höchsten Konzentrationen der Stoffe aufweisen, waren sowohl relativ große Flüsse, als auch kleine schmale Bäche. Der Fluss mit den meisten verschiedenen Substanzen der 29 untersuchten Antibiotika war die Wupper mit bis zu 11 Stoffen. Im Rhein waren bis zu neun der Substanzen zu finden. Demgegenüber zeigte ein kleiner Bach (Rotterbach) im Rhein-Sieg-Kreis Gehalte von 11 verschiedenen Antibiotika. Auch ein relativ kleiner Bach wie der Neffelbach wies acht Substanzen in z.T. vergleichsweise hohen Konzentrationen auf⁵⁹. Ebenfalls acht der 29 Stoffe waren in Agger und Erft nachweisbar.

Von der Höhe der Gehalte gesehen, zeigten sich Wupper, Erft, Agger, aber auch Rotbach, Neffelbach, Wörmkebach und Rotterbach als besonders belastet. Bei einem Fluss wie der Wupper ist dies nicht verwunderlich, wo sie doch als stark anthropogen beeinflusst gilt und zeitweise Abwasseranteile von 40 % aufweist. Als Summe der 29 Antibiotika war hier eine Konzentration im April von über 600 ng/L vorhanden. Die Summenkonzentration in der Erft betrug im gleichen Monat mehr als 250 ng/L, in der Agger mehr als 220 ng/L, aber auch in den kleinen Gewässern wie Rotterbach mehr als 400 ng/L, Wörmkebach 160 ng/L, Neffelbach 190 ng/L (siehe Tab. 28).

Grund für die hohen Gehalte beispielsweise im Rotterbach war eine Kläranlage, die nahe der Probenahmestelle die geklärten Abwässer einleitet. In kleinen Gewässern hat ein solcher Eintrag einen stärkeren Einfluss auf die Konzentrationen als ein ebensolcher Eintrag in einem größeren Fluss bewirken würde.

⁵⁹ Größenverhältnisse Die Wupper ist einer der größeren Flüsse im Untersuchungsgebiet, mit einem Gesamtwasserabfluss im Jahr 2003 von 463,6 Mio. m³. Der Neffelbach zählt mit einem Gesamtwasserabfluss im Jahr 2003 von 14,5 Mio. m³ zu den relativ kleinen Gewässern.

Table 28: *Antibiotika-Gehalte in ausgewählten Oberflächengewässern in Ostwestfalen (Januar 2002), Niederrhein (Dezember 2001), Großraum Köln-Bonn (April 2002) [ng/L]*

	Ampicillin	Flucloxacillin	Piperacillin	Azithromycin	Clarithromycin	Clindamycin	Erythromycin	Roxithromycin	Trimethoprim	Sulfadimidin	Sulfamethoxazol	Ciprofloxacin	Ofloxacin
Boker-Heide-Kanal					4	3	65	4			4		
Emmer				1	2	5	49	6		7	19		
Nethe					4	3	46	5	4	3	34		
Pader					1		4						
Weser				3	8	6	89	10	12	3	35		5
Wörmkebach				1			135	12	3		12		
Niers							4						
Rotterbach		7	48	2	37	24	190	14	8		52	9	20
Agger				1	7	15	117	9	30	2	46		
Erfte				4	19	15	132	11	18		62		5
Rhein					8	7	58	5	7		36		
Neffelbach					9	16	113	7	14		34		
Wupper	26	10		13	18	32	304	31	71		98		4

Es lässt sich also nicht pauschal sagen, dass größere Gewässer stärker belastet sind, als kleinere, da immer der Einzelfall betrachtet werden muss. Wenn nun also ein wasserreicherer Fluss, wie die Erfte oder die Wupper höhere Konzentrationen aufweist, so ist dies bedingt durch einen entsprechend hohen Zufluss aus Kläranlagen. Dass die Werte im Rhein, verglichen damit niedriger liegen, hat letztlich mit dem verhältnismäßig geringeren Eintrag aus Kläranlagen und daher mit dem Verdünnungseffekt zu tun.

4.2.3.2 Gewässerscreening

a) Erläuterungen zur Substanzauswahl

In den Untersuchungen zum Substanzscreening konnte festgestellt werden, dass von den 29 betrachteten Substanzen nicht alle relevant in Bezug auf ihr Verhalten und ihre Verbreitung in der Umwelt sind. So waren Penicilline und Tetracycline nur sehr selten und in Konzentrationen nahe der Bestimmungsgrenze zu finden. Auch von den Makroliden konnten ein paar Substanzen nicht in den Gewässern nachgewiesen werden.

Somit wurde für ein umfangreiches Gewässerscreening (auch für die Untersuchung in Zeitreihen) eine Auswahl an Substanzen getroffen, in der zum einen die umweltrelevanten Stoffe enthalten waren, also Stoffe, die von der Verschreibungszahl recht bedeutsam sind und gleichzeitig durch ihre höhere Stabilität und ihre geringe Sorptionsfähigkeit nur moderat am Eintrag in die Oberflächengewässer behindert werden und in nachweisbaren Konzentrationen dort vorliegen. Zum anderen sollte die Auswahl Stoffe berücksichtigen, an deren Auftreten direkt erkannt werden konnte, ob ein Eintrag aus dem kommunalen Abwasser erfolgt war und somit diese Stoffe aus der Humananwendung stammten bzw. ob der Eintrag aus der Veterinäranwendung und damit wahrscheinlich aus der Landwirtschaft erfolgt war.

Mit der gefundenen Auswahl wurde eine Reduzierung der Anzahl von 29 Stoffen auf neun vorgenommen. Darin waren Fluorochinolone, Makrolide (und Lincosamide), Sulfonamide und β -Lactamantibiotika enthalten (siehe Tab. 29).

Es wurde versucht, in den verschiedenen Antibiotikaklassen Substanzpaare zu finden, deren Vertreter entweder alleinig nur in der Veterinär- oder der Humanmedizin angewendet werden. Dies sind die Paare: Ciprofloxacin-Enrofloxacin, Sulfadimidin-Sulfamethoxazol, Tylosin-Clindamycin⁶⁰. Zusätzlich wurde noch Trimethoprim als Synergist untersucht, welches in beiden Bereichen zur Anwendung kommt, aber vor allem in Kombination mit Sulfamethoxazol Bedeutung hat. Als Vertreter der Penicilline wurde Phenoxymethylpenicillin betrachtet, welches zwar im Substanzscreening zuvor noch nicht gefunden werden konnte, welches aber sehr hohe Anwendungsmengen hat und zumindest im Kläranlagenzulauf hohe PEC-Werte aufweist.

⁶⁰

Als eigentliches Pendant zu Tylosin kann auch das Makrolid Erythromycin betrachtet werden, welches v.a. im Humanbereich, aber nicht ausschließlich angewendet wird.

Tabelle 29: *Untersuchte Antibiotika in Oberflächenwasser, ihre Antibiotikaklassen und Anwendungsorganismen*

Substanz	Antibiotikaklasse	Anwendungsorganismus*
Ciprofloxacin	Fluorochinolone	Mensch
Enrofloxacin	Fluorochinolone	Tier
Sulfadimidin	Sulfonamide	Tier
Sulfamethoxazol	Sulfonamide	Mensch
Trimethoprim	Sulfonamide – Synergist	Mensch, Tier
Erythromycin	Makrolide	Mensch, Tier
Tylosin	Makrolide	Tier**
Clindamycin	Lincosamide	Mensch***
Penicillin V	β-Lactamantibiotika	Mensch

* Mit dem Anwendungsorganismus Tier ist immer die Verwendung bei lebensmittelliefernden Tieren gemäß der VO 2377/90 gemeint, es kann auch sein, dass ein solches Mittel zusätzlich im Haus- und Kleintierbereich eingesetzt wird. Ist nur ein Anwendungsorganismus angegeben, so erfolgt ausschließlich dort die Anwendung; Ausnahmen siehe **, ***

** Tylosin war früher als Leistungsförderer zugelassen. Heute wird es nur noch zur therapeutischen Behandlung von Tieren eingesetzt. Im Humanbereich tritt es nicht als Wirkstoff auf; es wird aber in Impflösungen zur Impfung gegen Influenza aus Gründen der Konservierung in geringen Konzentrationen eingesetzt.

*** Es gibt von Clindamycin auf dem deutschen Markt ein Mittel, welches bei Hunden angewendet wird (Clindamycin von CPPharma [40]). Die Verabreichung an zur Nahrungsmittelproduktion genutzte Tiere ist jedoch nicht gestattet. Ansonsten ist Clindamycin alleinig für den Humanbereich bestimmt.

Da PCV ausschließlich im Humanbereich angewendet wird, könnte an dessen Auftreten ein Eintrag aus häuslichen Abwässern weiter bestätigt werden⁶¹. Zwar sind auch Ampicillin und vor allem Amoxicillin (häufigstes Antibiotikum) wichtige Vertreter der β-Lactamantibiotika, weil sie aber gleichermaßen im Veterinärbereich häufig eingesetzt werden, könnte aus ihren Befunden nicht auf einen bestimmten Eintragspfad geschlossen werden. Bei den Makroliden Azithromycin, Clarithromycin und Roxithromycin wäre dies möglich, da sie ausschließlich

⁶¹ PCV

Phenoxymethylpenicillin ist gemäß VO 2377/90 auch zur Anwendung in Tieren gestattet, die zur Nahrungsmittelproduktion genutzt werden, jedoch existiert gemäß Lila Liste auf dem deutschen Markt kein Mittel dieses Wirkstoffs.

im Humanbereich angewendet werden. Als Vertreter dieser Gruppe wurde aber Erythromycin betrachtet, von welchem es zwar auch Präparate für die veterinärmedizinische Anwendung gibt, welches aber vor allem im Humanbereich sehr viel häufiger angewendet wird. Insgesamt werden Makrolide in der Veterinärmedizin in Deutschland nur sehr selten angewendet. Gemäß Thiele-Bruhn [83] waren das in verschiedenen Regionen Deutschlands höchstens 1 % der Gesamtveterinärantibiotika. Davon hat allerdings Tylosin eine bedeutend stärkere Verbreitung als Erythromycin. Eine Erhebung im Land Brandenburg zur Verwendung von Tierarzneimitteln zeigte 1998/1999, dass innerhalb eines Jahres etwa 6600 kg an Antibiotika im gesamten Bundesland verbraucht wurden. Davon entfielen 80 kg (1,2 %) auf Tylosinpräparate. Andere Makrolide, wie Erythromycin und Spiramycin wurden hingegen überhaupt nicht verwendet [81]. Erhebungen in anderen Regionen [82, 187] zeigten ebenfalls, dass Tylosin das vorherrschende Makrolid im Veterinärbereich ist, dass Erythromycin kaum verwendet wird und es somit vor allem als Humanantibiotikum betrachtet werden kann.

b) Erläuterungen zur Gewässerauswahl

Zum Gewässerscreening sollte eine große Auswahl an Oberflächengewässern untersucht werden, die aus verschiedensten Teilen Nordrhein-Westfalens stammten. Dazu waren in Kap. 4.2.3.1 schon 24 Flüsse und Bäche aus dem Gebiet des Niederrheins, Ostwestfalens und dem Großraum Köln-Bonn beschrieben worden. Zur Ergänzung wurden weitere Proben gezogen, die aus anderen Teilen des Landes stammten, nämlich aus dem Hochsauerlandkreis und den Kreisen Wesel und Steinfurt (siehe Abb. 37).

Mit der Auswahl dieser Gebiete sollten Gewässer aus Regionen Nordrhein-Westfalens mit sehr unterschiedlichen Flächennutzungen (Gewerbe, Landwirtschaft, Besiedlung) in das Screening einbezogen werden.

Um den Einfluss eines dichtbesiedelten Gebietes auf die Gehalte von Antibiotika in Oberflächengewässern zu erkennen, dienten vor allem Proben aus dem Großraum Köln-Bonn, besonders in direkter Nähe zu den Städten. Diesen gegenüber gestellt wurden Proben aus stark landwirtschaftlich geprägten Gegenden, wie aus den äußeren Bereichen des Großraumes Köln-Bonn, mit den Kreisen Düren und Erftkreis, vor allem aber aus dem Gebiet Ostwestfalen und dem Hochsauerlandkreis mit großem Anteil an Intensivtierhaltungsbetrieben. Ebenfalls stark ländlich geprägt sind die Gebiete des Niederrheins und des Hochsauerlandes.



Abbildung 37: Darstellung der Kreiskarte mit den eingezeichneten Probenahmegebieten in Nordrhein-Westfalen. Mit Ovalen umgrenzt sind die Gebiete, in denen Proben von Oberflächengewässern genommen wurden

Aus dem Kreis Steinfurt wurde eine Probe aus dem Frischhofsbachgebiet geholt, einem Landstrich, der durch intensiven Maisanbau geprägt ist und der mit einer Vielzahl von Entwässerungsgräben ausgestattet ist, die sich alle im Frischhofsbach vereinigen. Dadurch sollten an beliebiger Stelle in dem Gebiet ausgetragene Stoffe durch Beprobung des Baches erkannt werden, was in einem anderen Forschungsprojekt zum Monitoring von Pflanzenschutzmitteln im Maisanbau ausgenutzt wurde⁶².

⁶²

Projekt am Institut für Pflanzenernährung (damals: Agrikulturchemisches Institut) der Universität Bonn im Auftrag des MUNLV-NRW (damals MURL-NRW) von 1994-1997: „Untersuchungen zum Rückstandsverhalten von Pflanzenschutzmitteln in den Böden des Einzugsgebietes des Frischhofsaches oberhalb der Entnahmestelle zur Grundwasseranreicherung im Wasserwerk St. Arnold/Neuenkirchen, Kreis Steinfurt“ [146]

Es sollte also vor allem der Frage nachgegangen werden, ob in urbaneren Gebieten höhere Einträge an Humanpharmaka in die Gewässer zu verzeichnen sind, und ob in ländlich geprägten Gebieten vor allem Veterinärantibiotika in Bächen und Flüssen zu finden sind.

c) Erläuterungen zur Bedeutung des Probenahmezeitpunktes

Besonders Starkregenereignisse können dazu führen, dass nach jüngst erfolgter Gülleausbringung eine oberflächliche Abschwemmung geschieht, oder dass eine Versickerung und Bodenpassage durch Makroporen erfolgt. Auch starke Windverhältnisse während der Ausbringung mittels Streuteller können durch Verwehung zu einem Eintrag in ein Gewässer führen (siehe Kap. 2.7.2.4). Daher ist der Probenahmezeitpunkt mitunter bedeutsam für den Nachweis von Veterinärantibiotika. Nicht so sehr bedeutend sollte er bei dem Nachweis von Humanpharmaka sein, da durch Kläranlagen zumeist eine stetige Einleitung von geklärtem Abwasser erfolgt. Um also einen Eintrag der Landwirtschaft gezielt ausmachen zu können, bedarf es besonderer Kenntnisse der Ausbringungszeiten⁶³, der betroffenen Flächen, der Ausbringungsmengen und -art, und der Gehalte in den Güllen. Hat man diese umfangreichen Kenntnisse nicht, oder möchte anhand eines Screening lediglich erkennen, wie die grundsätzliche Belastungssituation der Gewässer aussieht, so ist ein Eintrag von Veterinärpharmaka nur durch eine große Probenanzahl zu erkennen, wodurch die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, den Moment einer Eintragungssituation auszumachen. Daher wurden die Gewässer nur als Tageseinzelprouben untersucht.

In den Proben des Substanzscreenings (Kap. 4.2.3.1) wurde erkannt, dass zwar Veterinärpharmaka zum Teil gefunden werden können, dass aber die Konzentrationen dabei meist (Sulfadimidin) im Bereich der Bestimmungsgrenze liegen. Es kann aber auch passieren, dass, wie im Fall des Tylosinfundes im Rotbach (90 ng/L), eine erhöhte Konzentration gefunden werden kann. In solchen Fällen bietet die Probenahme zu einem gewissen Zeitpunkt als Einzeltagesprobe die Möglichkeit, Eintragungsspitzen zufällig zu erkennen. Würde man Tagesmischproben nehmen, so würde dadurch die Gefahr bestehen, dass eine solche Spitze durch Verdünnungseffekte nicht mehr so deutlich zu erkennen ist, bzw. die Konzentrationen sogar unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Demgegenüber ist es bei Tageseinzelprouben

⁶³ Ausbringungszeitraum Gemäß Düngeverordnung § 3 (4) darf zwischen dem 15. November und dem 15. Januar keine Gülle, Jauche oder Geflügelkot ausgebracht werden. Es können jedoch Ausnahmegenehmigungen erteilt werden, so dass auch in Wintermonaten es zu einem Eintrag durch frisch applizierte Gülle kommen kann.

möglich, dass der Zeitpunkt einer Spitze gar nicht getroffen wird und es zu einem negativen Befund kommt. (zur detaillierteren Untersuchung des Tageszeiteinflusses, siehe Kap. 4.2.3.3.)

d) Screening von Fließgewässern

Mit der Untersuchung von Gewässern aus verschiedensten Gebiete Nordrhein-Westfalens kann man nicht zu der verallgemeinerten Schlussfolgerungen bezüglich des Auftretens von Human- und Veterinärpharmaka kommen, dass Gebiete des starken landwirtschaftlichen Gepräges durch erhöhte Konzentrationen an Veterinärantibiotika charakterisiert werden können.

So wiesen die Proben aus Ostwestfalen, vom Niederrhein und dem Hochsauerland von den Antibiotika Sulfadimidin, Enrofloxacin und Tylosin nur selten und nur geringe Konzentrationen auf. In den vier Proben des Hochsauerlandes (Frühjahr 2003), von denen es sich bei dreien um recht kleine Bäche handelt, konnten keine Veterinärantibiotika gefunden werden. Die Ruhr (vom Abflussvolumen etwa 10-20 x größer) enthielt nur geringe Gehalte der Humanantibiotika Erythromycin und Sulfamethoxazol. Spuren von letzterem (1 ng/L) waren auch in der Neger zu finden. In der Probe des Frischhofsbachgebietes, waren keine Gehalte der neun Antibiotika nachzuweisen. Die Proben des Kreises Wesel (nördlich des Ruhrgebietes), enthielten trotz der ländlichen Regionen, in denen sie verlaufen, nur Rückstände von Mitteln aus der Humananwendung. Dies ist zwar bei dem künstlichen Gewässer des Wesel-Datteln-Kanales noch zu erwarten, da er über eine Strecke von mehr als 40 km keine natürlichen Zuflüsse aufweist und vollkommen gerade und ohne zu mäandrieren verläuft, nicht jedoch bei einem natürlichen Fluss wie der Issel. Aus dem Gebiet Ostwestfalens waren sechs Proben untersucht worden, von denen drei messbare Gehalte des Veterinärantibiotikums Sulfadimidin enthielten (siehe Tab. 28). Tylosin war nicht zu finden (Enrofloxacin nicht untersucht). Ansonsten enthielten diese Gewässer Gehalte an Humanantibiotika, wie sie auch in anderen Gebieten des Landes vorkommen. Die Konzentrationen waren dabei ähnlich wie von manchem Gewässer im Raum Köln-Bonn. In der Probe der Niers (Niederrhein) war außer Gehalten von Erythromycin im unteren ng/L-Bereich kein weiteres von 29 Antibiotika zu finden.

Vergleicht man die Gewässer aus den mehr agrarisch geprägten Regionen mit denen aus dem Raum Köln-Bonn, so sieht man, dass auch dort vorwiegend Humanantibiotika gefunden wurden. Falls Veterinärantibiotika vorkamen, so lagen die Gehalte im einstelligen ng/L-Bereich. Aber auch in den Proben des dichtbesiedelten Köln-Bonner Raumes waren

gelegentlich Veterinärantibiotika zu finden. So wurden in der Wupper Gehalte an Enrofloxacin von maximal 9 ng/L gefunden, in Sieg, Agger und Rhein von ca. 4 ng/L. Ebenso konnten Rückstände dieses Fluorochinolons im Strunder Bach und im Vilicher Bach bestimmt werden, die zwar ebenfalls im Großraum fließen, aber zumeist in den ländlicheren Randbereichen. Wurden Gehalte von Enrofloxacin, Sulfadimidin oder Tylosin in den größeren Gewässern in den Ballungsgebieten erkannt, so stammten die Einträge wahrscheinlich noch aus den Bereichen, in denen das Gewässer im ländlichen Gebiet fließt, bzw. aus dessen Zuflüssen. Auch Sulfadimidin konnte in den Flüssen des Köln-Bonner Raumes erkannt werden, wenn auch nur selten und ebenfalls in niedrigen Konzentrationen bis 8 ng/L (Vilicher Bach), aber auch in der Swist und im Jungbach bis 7 ng/L, sowie in weiteren Gewässern in noch geringeren Gehalten.

Anhand des Vorkommens von bestimmten Substanzen lassen sich die verschiedenen Regionen Nordrhein-Westfalens nicht klassifizieren. Das Spektrum der vorkommenden Antibiotika ist sowohl in ländlichen Gebieten, als auch in urbanen Regionen sehr vergleichbar. Es sind vor allem Humanantibiotika zu finden und nur gelegentlich Veterinärantibiotika. Letztere sind nicht einschränkend nur in bestimmten Regionen zu finden, sondern in verschiedensten Gewässern des Landes.

Erschwert wird eine Aussage über veterinärmedizinisch genutzte Fluorochinolone, da Ciprofloxacin ein Abbauprodukt von Enrofloxacin nach Abspaltung der Ethylgruppe ist (siehe Abb. 5) [124]. Werden in einem Gewässer Gehalte an Ciprofloxacin gefunden, so kann es sein, dass diese ursprünglich aus einer Anwendung von EFL bei Tieren herrührt [100]. Zwar wurden CFL-Gehalte, wie in Kap. 4.2.3.1 c erwähnt, nur relativ selten gefunden, aber es ist durchaus möglich, besonders bei Proben, in denen messbare Konzentrationen von beiden Fluorochinolonen gleichzeitig gefunden wurden, dass auch hierfür ein Eintrag aus der Landwirtschaft verantwortlich ist.

Als einziger Unterschied der Proben aus gering besiedelten Regionen zu den aus urbaneren Räumen, scheint ein geringerer Gesamtgehalt an Antibiotika zu sein. Dafür spricht, dass in einigen der Gewässer überhaupt keine messbaren Konzentrationen gefunden wurden und in anderen nur sehr geringe Gesamtkonzentrationen (siehe Tab. 28, 30). Allerdings gibt es auch in den Ballungsgebieten einzelne Gewässer, in denen fast nie Antibiotika gefunden wurden oder nur sehr geringe Gehalte von ihnen. Auf der anderen Seite wiesen einzelne Gewässer des ländlichen Raumes dagegen sehr hohe Konzentrationen auf, wie anhand des Wörmkebaches und des Rotterbaches gezeigt werden konnte (siehe Tab. 30).

Tabelle 30: Gesamtkonzentrationen als Summe von neun Antibiotika in Gewässern verschiedener Regionen Nordrhein-Westfalens, Proben aus Ostwestfalen April 2002, Niers, Rotterbach Dezember 2001, Region Niederrhein Januar 2003, Sauerland, April 2003, Köln-Bonn Mai 2003

Region	Gewässer	Konz. [ng/L]	Gewässer	Konz. ng/L]
Köln-Bonn	Agger	74	Rotbach	22
	Ahrenbach	6	Rotterbach*	261
	Bröl	79	Sieg	51
	Bruchbach	0	Siegl. Mühlgraben	74
	Dhünn	50	Strunder Bach	0
	Erf	149	Swistbach	212
	Jungbach	12	Vilicher Bach	0
	Neffelbach	93	Wupper	264
	Rhein	28		
Ostwestfalen	Boker-Heide-Kanal*	78	Pader*	8
	Emmer*	75	Weser*	135
	Nethe*	85	Wörnkebach*	142
	Frischhofsbach	0		
Hochsauerland	Elpe	0	Ruhr	24
	Neger	1	Valme	0
Niederrhein	Issel	3	Wesel-Datteln-Kanal	46
	Niers*	4		

* Summe ohne EFL

Sowohl in Bezug auf die Gewässergröße, als auch in Bezug auf die Region sind allgemeine Aussagen daher nur sehr schwierig zu treffen. Vielmehr muss die Einzelsituation in einem Gewässer, mit dessen Einzugsgebiet und den Kläranlageneinleitungen betrachtet werden (siehe Kap. 2.7.1.6).

Die höchstbelasteten Gewässer waren in diesem Gewässerscreening einerseits größere Flüsse, wie Wupper und Erf, im Großraum Köln-Bonn, die einen relativ hohen Abwasseranteil aufweisen, die aber auch große Teile ihrer Einzugsgebiete in landwirtschaftlich genutzten Gegenden haben. Andererseits zählten auch kleinere Bäche, wie die beiden erwähnten, die ausschließlich in ländlichen Regionen fließen, zu den höchstbelasteten. Geht man bei den

Gewässern ins Detail, so erkennt man, dass die hohen Konzentrationen fast immer aufgrund des Eintrages von geklärtem Abwasser herrühren. Dies konnte schon beim Rotterbach gesehen werden (siehe Kap. 4.2.3.1 f). Im Fall des Wörmkebaches (Kreis Lippe), der fast nur durch bewirtschaftete Flächen fließt, waren es zwei Kläranlagen (Lügde-Elbrinxen und Lügde-Rischenau) mit ca. 5000 angeschlossenen Einwohnern, von denen die Einträge stammten.

e) Untersuchung eines stehenden Gewässers

Zusätzlich zum Screening von Fließgewässern, wurde auch ein stehendes Gewässer beprobt. Es handelt sich dabei um den Rotter See bei Sieglar, der aus einer ehemaligen Kiesgrube entstanden ist. Im Sommer dient er in einem stark frequentierten Naherholungsgebiet als Badegewässer. Da er vor allem von Kindern und Jugendlichen genutzt wird, stand hier die Beantwortung der Frage im Vordergrund, ob dermal aufgetragene Antibiotika aus der Aknebehandlung nachgewiesen werden können, also besonders Clindamycin und Erythromycin. Dazu wurde er im Dezember 2002 (ohne Badenutzung), Anfang September (Sommer mit intensiver Badenutzung) und im November 2003 beprobt.

Ein Eintrag von Humanantibiotika und somit auch von Anti-Aknemitteln konnte weder im Winter noch im Sommer nachgewiesen werden. Topisch aufgebraute Antibiotika hatten daher in diesem exponierten Stehgewässer keine Auswirkung auf die Gehalte. Das einzige Antibiotikum, welches gefunden werden konnte, war mit 4 ng/L Enrofloxacin im September⁶⁴. Ein Eintrag davon ist möglicherweise durch umliegende Felder zu begründen. Der See selbst liegt vom Niveau deutlich unterhalb der Umgebung, weshalb entweder durch Versickerung nach Gülleausbringung Stoffe das Wasser erreichen können, oder aber durch den Einfluss von Grundwasser. Ist das Grundwasser unterhalb der Felder enrofloxacinhaltig, so kann es je nach Höhe des Grundwasserpegels zu einer Vermischung mit dem Oberflächenwasser und damit zu einer Kontamination kommen.

⁶⁴

im Dezember und November war keines der neun Antibiotika nachweisbar

4.2.3.3 Tagesgang

Der Zeitpunkt der Probenahme kann durchaus einen gewissen Einfluss auf die Ergebnisse haben (siehe Kap. 4.2.3.2 c). Daher wurde die tageszeitliche Veränderung der Konzentrationen am Beispiel eines Flusses überprüft. Die Wupper bei Rheindorf wurde dazu an einem Tag im Abstand von drei Stunden viermal beprobt (09.00 Uhr, 12.00 Uhr, 15.00 Uhr, 18.00 Uhr), sowie am folgenden Tag um 13.00 Uhr. In den Proben konnten jeweils vier der neun untersuchten Substanzen bestimmt werden (siehe Abb. 38).

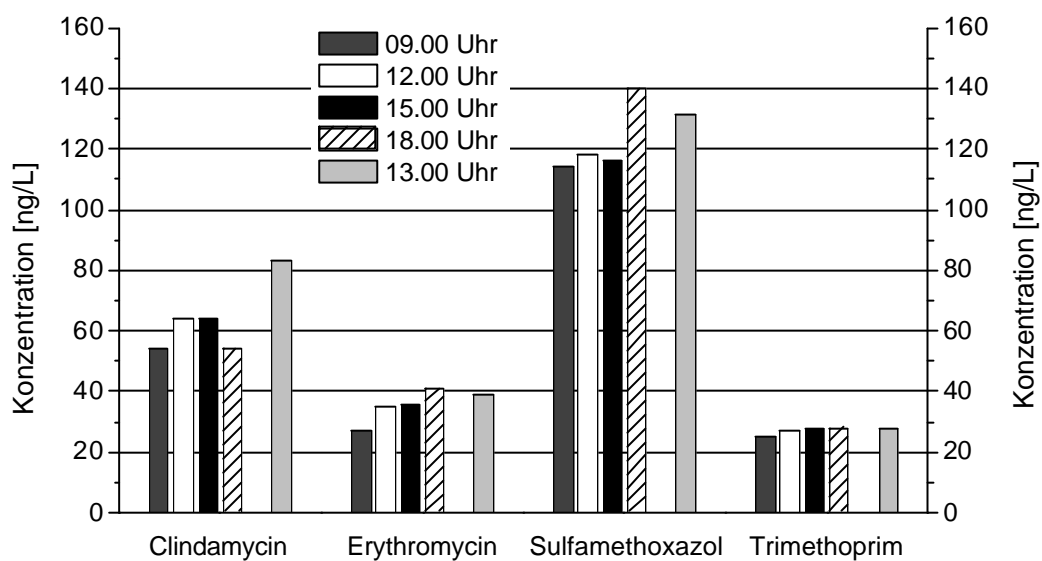


Abbildung 38: Tagesgang der Antibiotikakonzentrationen in der Wupper bei Leverkusen-Rheindorf [ng/L]

Man erkennt, dass sich die Proben nicht besonders stark unterschieden. Lediglich die 18 Uhr Probe bei Sulfamethoxazol wies erkennbar höhere Gehalte auf, als zu den anderen Tageszeiten. Den Unterschieden bei Clindamycin ist wegen der niedrigen Wiederfindungsrate nur geringes Gewicht beizumessen. Ein Trend war innerhalb dieses Tages nicht zu erkennen, auch nicht im Vergleich mit der Probe, die einen Tag später gezogen wurde. Als Anhaltspunkt für die Ähnlichkeit zwischen den Proben kann die Standardabweichung betrachtet werden:

Tabelle 31: Mittelwerte und Standardabweichungen der Tagesgangproben in der Wupper [ng/L]

	Clindamycin	Erythromycin	Sulfamethoxazol	Trimethoprim
Mittelwert [ng/L]	63,80	35,60	123,80	27,20
Stabw. [ng/L]	11,84	5,37	11,23	1,30
rel. Stabw. [%]	18,56	15,07	9,07	4,79

Verglichen mit den Standardabweichungen aus der Vierfachbestimmung einer Probe (anhand der Erft, Kap. 4.1.3.4, Tab. 24) haben hier die relativen Standardabweichungen in etwa die gleiche Größe. Somit unterschieden sich diese Tagesgangproben in ihren Gehalten nicht mehr, als es die Mehrfachbestimmung einer einzelnen Probe getan hat.

Anhand dieser Probe war also keine bestimmte Abhängigkeit der Gehalte im Tagesverlauf zu erkennen. Auch wenn keine Probe in den Nachtstunden gezogen wurde, so wäre auch dann wahrscheinlich kein anderes Ergebnis erhalten worden. Geht man davon aus, dass die Antibiotikaeinträge aus Kläranlagenabflüssen stammen, so werden die Gehalte im Gewässer durch die gesamten, im Einzugsgebiet vorhandenen, Kläranlagen bestimmt. Im Flussgebiet der Wupper sind dies zehn kommunale Abwasserbehandlungsanlagen mit knapp 800.000 angeschlossenen Einwohnern [159]. Da die Kläranlagen zumeist kontinuierliche Einleiter sind, hat man auch keine großen Schwankungen in den Gehalten. Aber auch wenn nicht alle von ihnen kontinuierlich die Abwässer der Wupper und den zum Flussgebiet gehörenden Gewässern zuführen, so tritt doch über die Gewässerlänge eine gewisse Nivellierung ein. Vor allem aber dauert es eine Zeit, bis das Wasser von dem oberen Wupperabschnitt bis zur Mündung in den Rhein (Probenahmestelle) fließt, wodurch beispielsweise Nachteinleitungen aus Wuppertal auch erst innerhalb des nächsten Tages an der Mündung sind. Da die Kläranlagen über die gesamte Flusslänge verteilt sind, hat man folglich an der Mündung zu jeder Zeit ein Gemisch aus Abflüssen aus der Nacht und vom Tag⁶⁵. Ein Einfluss der Tageszeit sollte also in einem solchen Gewässer kaum auszumachen sein. Lediglich bedingt durch starke Regenereignisse, durch die innerhalb kurzer Zeit Veränderungen der

65

Die Nachtabflüsse einer Kläranlage dürfen nicht gleichgesetzt werden mit dem Abwasser, das zur Nacht in den Haushalten anfällt, da die Behandlung in den Kläranlagen eine gewisse Zeit dauert, die je nach Typ sehr unterschiedlich ist. Je nach Größe der Behandlungsbecken tritt auch in den Kläranlagen selbst eine Vermischung von Abwässern verschiedener Tageszeiten ein.

Wasserabflussmengen der Flüsse zustande kommen können, ist auch innerhalb eines Tages mit gewissen Schwankungen der Gehalte, bedingt durch den Verdünnungseffekt dem das Abwasser dann unterliegt, zu rechnen. Ein solches Ereignis lag an den beiden Tagen allerdings nicht vor (Pegelstände in Leverkusen-Opladen 55-58 cm). Daher waren die Konzentrationen annähernd gleich, und ein Einfluss der Tageszeit (zumal Schwankungen der Einleitungen in einem größeren Gewässer ja kaum auftreten dürften), nicht erkennbar.

Anders kann es direkt unterhalb von Kläranlageneinflüssen sein, sofern diese nicht kontinuierlich einleiten. Hier kann es innerhalb kürzester Zeit zu sehr großen Unterschieden kommen, was anhand des Vilicher Baches erkannt werden konnte. Nahe der Mündung in den Rhein wurde eine Probe bei sehr hohem Wasserstand genommen. Diese Pegelhöhe kam dadurch zustande, dass die Kläranlage Bonn-Beuel (ca. 70.000 angeschlossene Einwohner) gerade zu dem Zeitpunkt Abwasser in den Bach einließ. Hat man an der Probenahmestelle üblicherweise eine Wassertiefe von ca. 15 cm, so war sie bei der Einleitung auf 35-40 cm angestiegen. Dabei konnte man sehen, dass ein Wehr der Kläranlage geöffnet war, woraus das Wasser sich in den Bach ergoss. Zwei Stunden später wurde erneut eine Probe des Vilicher Baches entnommen. Zu der Zeit war das Wehr allerdings geschlossen und der Bach hatte die übliche Normalhöhe von etwa 15 cm.

In der Probe des Baches mit geschlossenem Wehr waren keine Rückstände der neun Antibiotika zu finden. Die Probe hingegen, die zwei Stunden zuvor entnommen wurde, enthielt, außer Phenoxymethylpenicillin, alle der untersuchten Humanantibiotika, mit Gehalten von bis zu 55 ng/L (Sulfamethoxazol). Veterinärantibiotika waren darin nicht zu finden. Da das untersuchte Wasser zum größten Teil aus reinem kommunalen Abwasser bestand, ist dies auch nicht weiter verwunderlich. Es konnten des weiteren Ciprofloxacin mit 7 ng/L, Clindamycin mit 20 ng/L, Erythromycin mit 21 ng/L und Trimethoprim mit 30 ng/L nachgewiesen werden⁶⁶.

Hier hat man also den Effekt, dass der Zeitpunkt der Probenahme bei nicht kontinuierlicher Einleitung von Abwässern bei manchen Gewässern durchaus einen großen Einfluss auf die Gehalte im Gewässer hat. Dabei können sich je nach Einleitungssituation die Konzentrationen im Gewässer von einer Minute zur nächsten hin schlagartig ändern (wie hier zu sehen,

⁶⁶ Probenahme

Hätte man an dem Tag eine integrierte Probe (Tagesmischprobe) untersucht, so wäre diese Einleitung nicht so deutlich zu sehen gewesen. Hier zeigte die Einzelprobenahme den Vorteil, dass eine Spitze der Gehalte gefunden werden konnte, die Probe mit einer weiteren Probe des gleichen Tag verglichen werden konnte und als Ursache eindeutig die kommunale Abwasserbehandlung der Kläranlage Bonn-Beuel ermittelt wurde.

messbare Gehalte um 11 Uhr, um 13 Uhr hingegen keine Gehalte mehr zu finden). In solchen kleinen Bächen mit nur einem bekannten Einleiter sieht man diesen Effekt besonders, zumal der Bach gewöhnlicher Weise sehr wenig Wasser führt und in Zeiten längerer Trockenheit sogar komplett versiegt, so dass dann durch eine Abwassereinleitung das spontan wieder vorhandene „Bachwasser“ aus reinem Abwasser besteht. Würde die Kläranlage kontinuierlich einleiten, so hätte man (abgesehen von Pegeländerungen durch Wetterereignisse) wahrscheinlich ebenso wie in der Wupper nur geringe Schwankungen der Gehalte innerhalb eines Tages, da auch das Kläranlagenabwasser innerhalb eines Tages sich in den Gehalten nicht stark verändern wird (mögliche Gründe: Mischung oder Sammlung von Abwässern verschiedener Tageszeiten in der Kläranlage, Batchbetrieb, Verweil- und Behandlungsdauer in der Kläranlage). Bei Flüssen, in die mehrere Kläranlagen einleiten, oder die deutlich mehr Wasser führen, sind die Unterschiede innerhalb eines Tages nicht so deutlich, da der Effekt der batchweisen Einleitung einer einzelnen oder von wenigen Kläranlagen über den Flussverlauf hin und durch Einleitung aus mehreren kontinuierlich einleitenden Kläranlagen, sowie auch durch unterschiedliche Fließgeschwindigkeiten der zulaufenden Bäche und Flüsse etwas gemindert und möglicherweise sogar ausgeglichen wird.

4.2.3.4 Monatszeitreihen

Im Abstand von zwei Monaten wurden 16 Gewässer des Großraumes Köln-Bonn, die auch in den Untersuchungen zum Substanzscreening von November 2001 und April 2002 beprobt worden waren, über eine Zeit von mehr als einem Jahr untersucht. Der Beginn dieser Untersuchungen war im Dezember 2002. Ab Januar 2003 wurden die Proben dann im Abstand von zwei Monaten gezogen, so dass bis Januar 2004 insgesamt acht Probenahmetermine anstanden.

Allgemein wurde in den Proben wieder die Aussage aus Kap. 4.2.3.1 bestätigt: Am häufigsten waren Substanzen aus der Humananwendung zu finden und nur selten solche aus dem Veterinärbereich. Am häufigsten traten Erythromycin, Sulfamethoxazol und Clindamycin in den Proben auf. Daneben aber nahezu genau so oft Trimethoprim. Die Substanzen Ciprofloxacin und Phenoxymethylpenicillin, die ebenfalls in der Humanmedizin angewendet werden, traten dagegen vereinzelt auf, bzw. letztere nur in zwei Proben im März. Veterinärantibiotika wie Enrofloxacin und Sulfadimidin konnten nur gelegentlich gefunden werden, Tylosin hingegen gar nicht. Die Konzentrationen der Veterinärantibiotika, sowie der selten auftretenden Humanantibiotika (CFL, PCV) lagen meist im einstelligen ng/L-Bereich. Höchste Konzentrationen waren von Sulfamethoxazol und Erythromycin zu finden, die mit bis zu 200 ng/L in den Proben vorhanden waren. Auch von Clindamycin waren solche Gehalte zu finden, die aber im Hinblick auf die sehr niedrige Wiederfindungsrate kritischer zu betrachten sind (siehe Kap. 4.1.3.3). Trimethoprimgehalte lagen meist bei 10-20 ng/L, erreichten bis zu 50 ng/L, und waren folglich in einem deutlich niedrigeren Bereich als Sulfamethoxazol.

Auch in diesen Proben konnte gezeigt werden, dass die berechneten PEC_{OW} -Werte gemäß Tab. 7 relativ gut in vielen Gewässern wiedergefunden werden konnten. Allerdings lagen die tatsächlichen Gehalte von Erythromycin und von Trimethoprim meist ein wenig niedriger als die kalkulierten. Die PEC-Werte von Ciprofloxacin, die mit 22 ng/L berechnet waren, lagen in den Realproben mit höchstens 17 ng/L und meistens etwa 10 ng/L ebenfalls niedriger⁶⁷ (zur Begründung siehe auch S. 241). Von den neun untersuchten Substanzen waren in den Proben gewöhnlich vier (CLI, ERY, SMX und TRI), manchmal auch fünf, zu finden. In gewissen

⁶⁷

Es ist zu berücksichtigen, dass bei der MS-Messung eine gewisse Ionensuppression geschieht, weshalb geringere als die tatsächlichen Gehalte bestimmt werden. Diese Ionensuppression ist von der jeweiligen Probe abhängig, taucht aber z.T. in den vorher bestimmten Wiederfindungsraten auf, mit denen die Proben verrechnet werden.

gering exponierten Gewässern waren z.T. gar keine Gehalte zu finden, oder aber nur geringe Gehalte von ein oder zwei Substanzen. Weniger die Anzahl der verschiedenen Substanzen, als vielmehr die Gehalte in den Oberflächengewässern unterschieden sich mitunter deutlich innerhalb der beobachteten Monate.

a) Variation in einzelnen Gewässern

Aufgrund der Praktiken der Verschreibung von Antibiotika zur Bekämpfung von Infektionen aller Art, würde man einen gewissen Grundbedarf ständig im Jahr vermuten. Dabei geht es um saisonunabhängige Anwendungen, wie Infektionen der Haut, der Augen, der Ohren, sowie Magen-Darm-Infektionen. Die Behandlung von Atemwegsinfektionen, der Luftwege und des Hals-Nasen-Ohren Bereiches wird zwar auch in gewissem Maße im gesamten Jahr durchgeführt. Akute Belastungssituationen dieser Infektionsarten mit vielen Betroffenen treten aber vermehrt im Winterhalbjahr auf, weshalb besonders in den Monaten November bis März erhöhte Verschreibungsraten von Antibiotika erwartet werden dürften. Da häufig auch bei der Behandlung von Viruserkrankungen wie Grippe oder bei grippalen Infekten, zur Vermeidung einer zusätzlichen bakteriellen Infektion, prophylaktisch Antibiotika gegeben werden, ist ebenfalls hierdurch vermehrt im Winter mit der Anwendung zu rechnen.

Folglich steht zu vermuten, dass es zwar einen Grundgehalt von Antibiotika im gesamten Jahr in den Flüssen gibt, dass aber besonders in den Herbst- und Wintermonaten mit einem erhöhten Eintrag zu rechnen ist. Im Sommer sollten hingegen nur geringe Gehalte zu finden sein. Auch McArdeil et al. [132] vermuteten und zeigten zum Teil, dass die variierenden Konzentrationen und Frachten in Kläranlagenabwässern und Oberflächengewässern mit den unterschiedlich hohen Verschreibungen im Sommer und Winter (doppelt so hoch, wie im Sommer) in Zusammenhang zu bringen sind.

In den hier untersuchten Gewässern resultierte ein unerwartetes Bild der Antibiotikagehalte innerhalb des Jahresverlaufs:

Viele der Proben zeigten im Dezember 2002 relativ hohe Summenkonzentrationen. Aber im gleichen Winter fiel die Konzentration der Stoffe dramatisch ab, so dass im Januar, also nur einen Monat später, nur noch ein Bruchteil der Gehalte gefunden werden konnte. Die Konzentrationen im Januar und März 2002 waren in den meisten der Gewässer die niedrigsten, die überhaupt gemessen wurden. Unerwarteter Weise stiegen die Konzentrationen in vielen der Gewässer zum Sommer hin an und zeigten im Juli und im September höhere Konzentrationen, als in Januar und März (siehe Abb. 39 a, b).

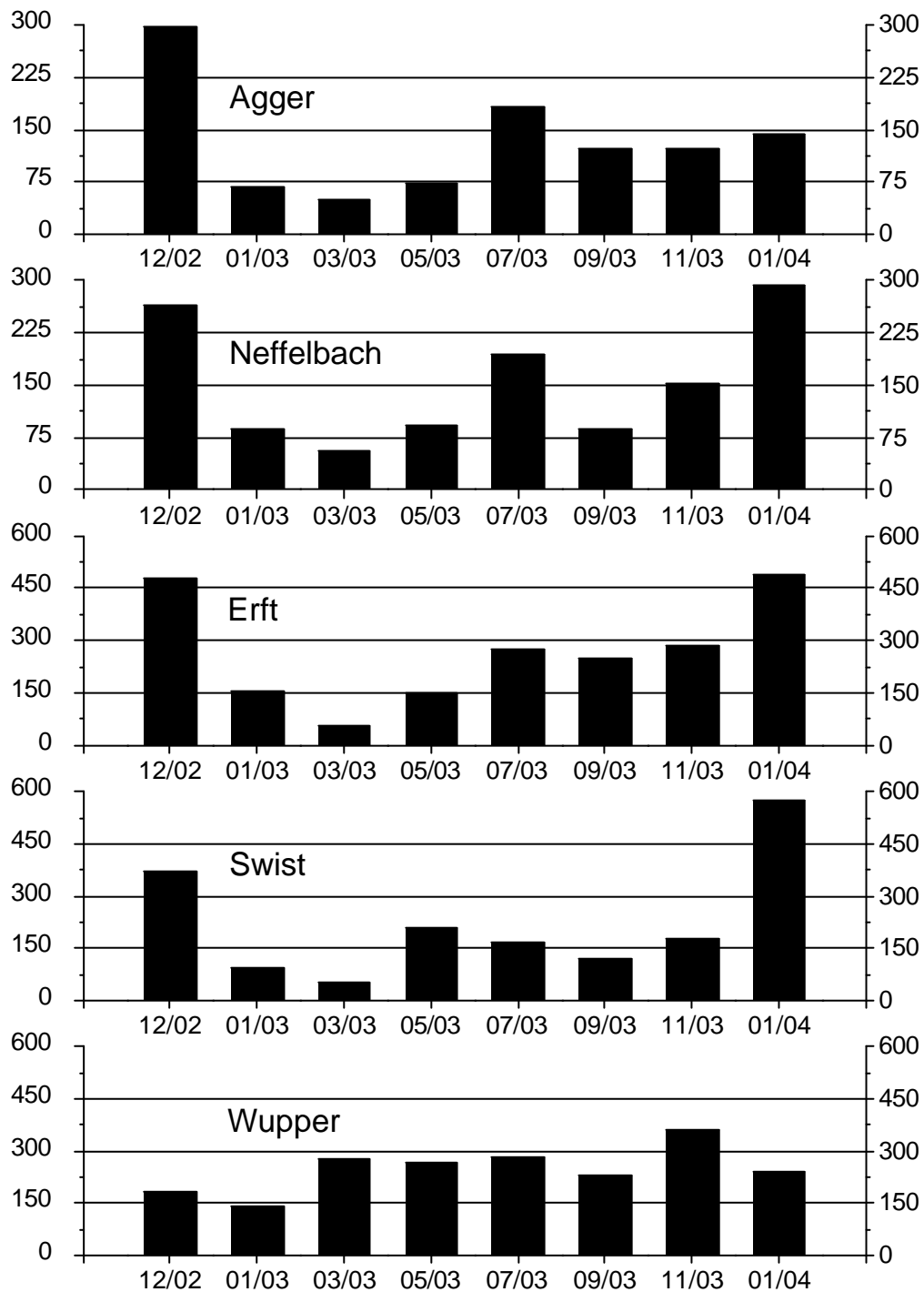


Abbildung 39 a: *Summenkonzentrationen von neun Antibiotika in verschiedenen Oberflächengewässern [ng/L], Entwicklung im Jahresverlauf zwischen Dezember 2002 und Januar 2004*

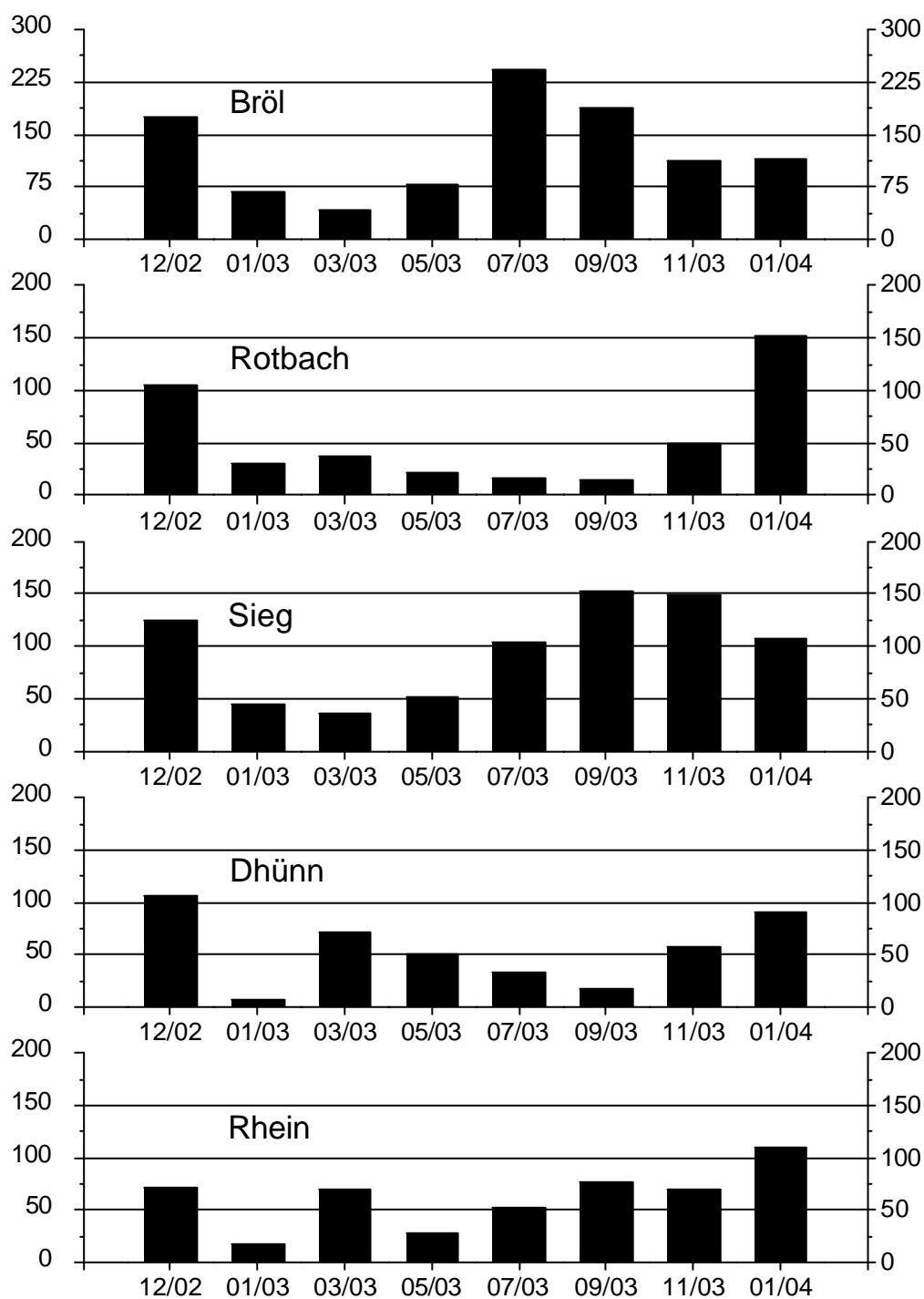
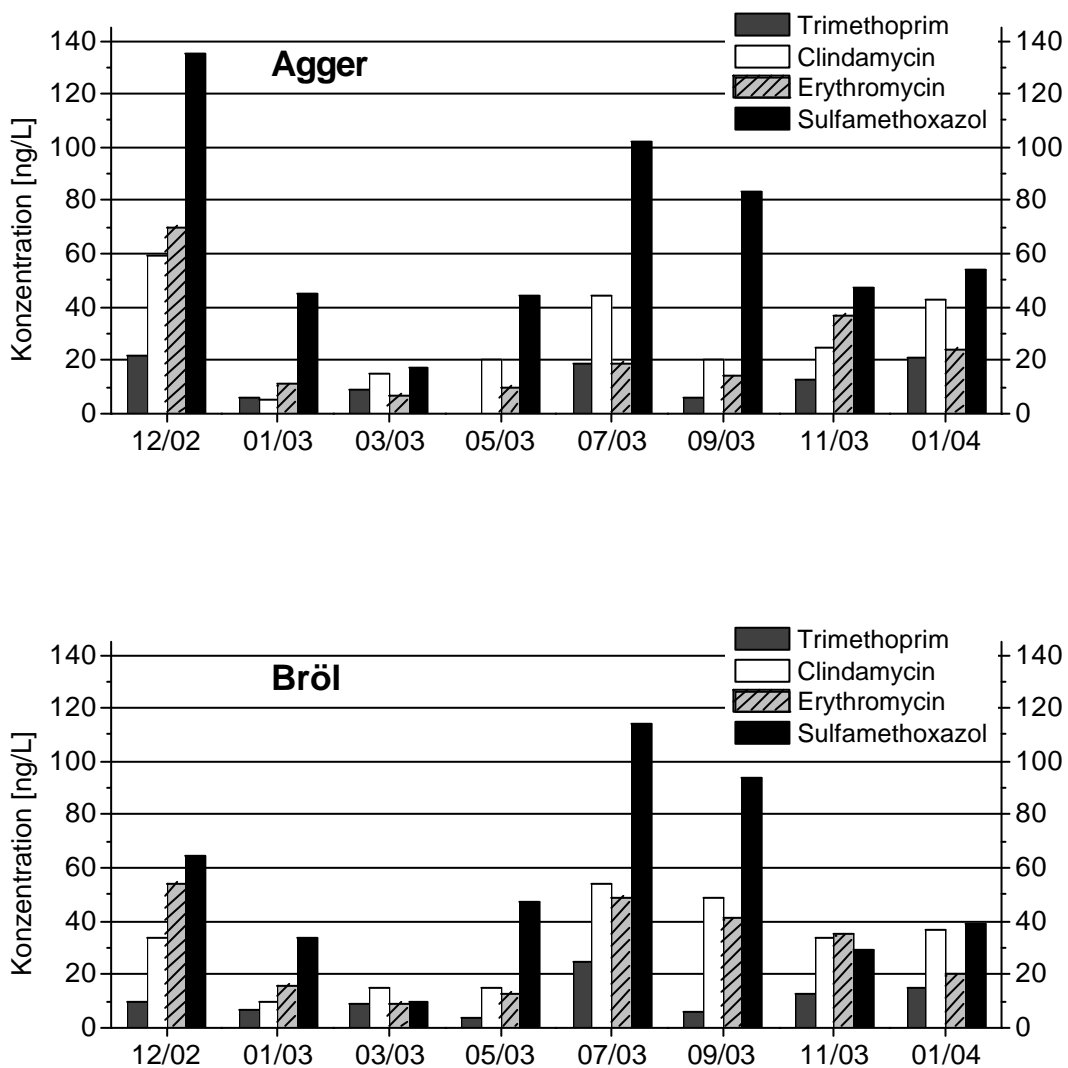


Abbildung 39 b: *Summenkonzentrationen von neun Antibiotika in verschiedenen Oberflächengewässern [ng/L], Entwicklung im Jahresverlauf zwischen Dezember 2002 und Januar 2004*

Wenn man davon ausgeht, dass eigentlich im Winter am meisten Antibiotika verschrieben werden, so stellt sich die Frage, warum in einem heißen Sommer 2003 höhere Antibiotikakonzentrationen resultieren, als im Winter zuvor. Des weiteren ist zu klären, warum die Konzentrationen von Dezember zum Januar und März hin so deutlich abfielen. Eigentlich sollte die Beschaffenheit und Zusammensetzung des Abwassers in diesen Wintermonaten relativ ähnlich sein und somit auch der Eintrag in die Gewässer.

Dieses Bild der sinkenden und steigenden Konzentrationen war nicht nur an der Summe der Antibiotika insgesamt zu sehen, sondern auch anhand der Entwicklung der Konzentration einzelner Substanzen (siehe Abb. 40).



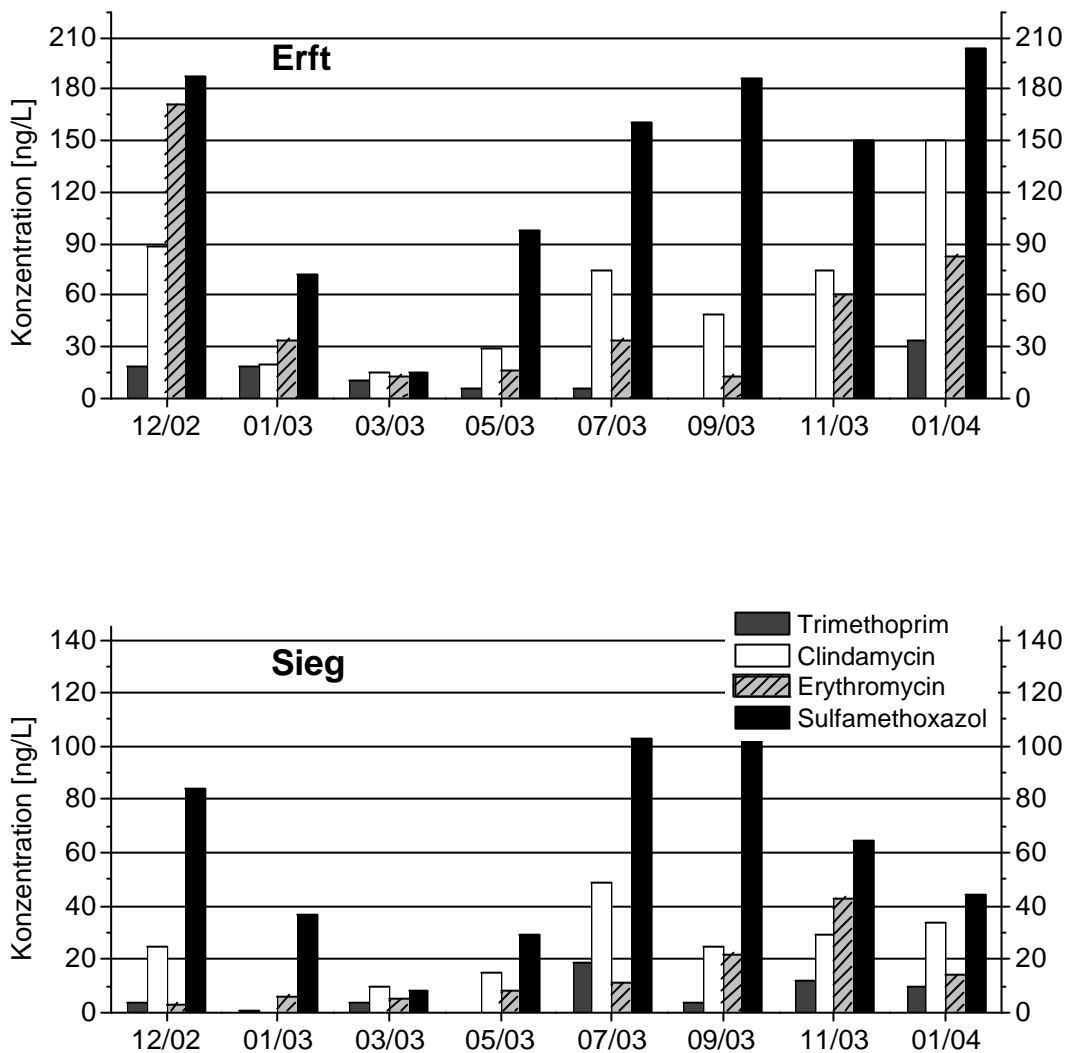


Abbildung 40: Konzentrationen von Trimethoprim, Clindamycin, Erythromycin und Sulfamethoxazol im Jahresverlauf von Dezember 2002 bis Januar 2004 in Agger, Bröl, Erft und Sieg [ng/L]

Grund für die gesunkenen Konzentrationen innerhalb eines Monats von Dezember zum Januar war ein Hochwasserereignis Anfang Januar. Mitte Dezember lagen die Pegelstände noch in einem Normalbereich, wohingegen sie Anfang Januar ihre absoluten Höhepunkte erreichten. Die Probenahme im Januar erfolgte eine Woche nach den Höchstständen. Stand beispielsweise der Rheinpegel am 17. Dezember noch auf 3,50 m in Köln, so erreichte er am 04. Januar 9,60 m, sank aber bis zur Probenahme am 14. Januar auf 4,60 m ab. Wird Abwasser mit Antibiotikagehalten in ein Gewässer eingeleitet, so hängt die resultierende

Konzentration mit der absoluten Wassermenge des Fließgewässers zusammen. Führt ein Fluss nun die doppelte Menge an Wasser, so wird dadurch das Abwasser viel stärker verdünnt und die Konzentrationen der Antibiotika sinken. Da das Volumen des kommunalen Abwassers mit den Wasserverbrauchsgewohnheiten der Bevölkerung relativ konstant ist, erfolgt dadurch auch ein relativ konstanter Eintrag von Abwasser aus Kläranlagen in die Vorfluter. Nimmt man an, dass in den Wintermonaten Dezember und Januar die Zusammensetzung des Abwassers, d.h. die Konzentration an Antibiotika relativ ähnlich ist, so ist die Umweltkonzentration in den Bächen und Flüssen alleine von der Wasserabflussmenge abhängig. Im Monat März 2003 lag erneut die Situation vor, dass die Pegelstände deutlich höher als normal und ähnlich denen im Januar waren.

Zum Sommer 2004 trat eine besondere Situation ein. In vielen Flüssen waren sehr hohe Konzentrationen von Antibiotika zu finden, was spontan vermuten ließe, auch der Konsum und der Eintrag aus Kläranlagen sei höher gewesen, so sonderbar dies auch in einem heißen Sommer wäre. Grund war aber vielmehr eine lange Trockenperiode mit nur sehr selten auftretenden Regenereignissen. Dadurch sanken die Flusspegelstände sehr stark ab. Diese Entwicklung begann ab dem Frühjahr 2003 und hielt bis zum Spätsommer hin an, so dass in den Gewässern ab Mai Niedrigwasserstände zu sehen waren. Dies bewirkt, dass das Abwasser aus den Kläranlagen keinem so starken Verdünnungseffekt mehr unterliegt und somit die Konzentrationen von Antibiotika in den Flüssen aufgrund des höheren prozentualen Anteils von Abwasser ebenfalls höher werden. Die Pegelstände stellen jedoch nur einen indirekten Hinweis auf die Situation in den Gewässern dar. Genauere Aussagen und Begründungen für die sehr unterschiedlichen Konzentrationen in den Gewässern im Jahresverlauf und den Einfluss von Trockenperioden oder Hochwasserereignissen sind erst durch die Gesamtabflussmengen der einzelnen Gewässer zu machen.

b) Wasserabflussmengen in Oberflächengewässern

Von neun der sechzehn untersuchten Bäche und Flüsse⁶⁸ konnten vom Landesumweltamt Köln (LUA, Außenstelle Bonn) die genauen Wasserabflussmengen zu den Probenahmezeitpunkten an den Pegelstandorten erhalten werden. Da die Probenahmeorte aber nicht genau am Pegelstandort liegen, mussten diese Abflussmengen erst darauf umgerechnet werden. Dies geschah mithilfe der Flächen der Einzugsgebiete: Bei mehreren Pegelstandorten an einem Fluss wurde der Pegelstandort berücksichtigt, der dem Probenahmeort am nächsten liegt. Der Wasserabfluss am Pegel wurde durch die Einzugsgebietsfläche am Pegelstandort dividiert und mit der Einzugsgebietsfläche am Probenahmeort (lässt sich aus speziellen Karten oder Programmen einsehen) multipliziert. So konnte zu jedem Zeitpunkt die genaue Wasserabflussmenge bestimmt werden. Trägt man die Entwicklung der Antibiotikakonzentrationen zusammen mit den Wasserabflussmengen auf, so erkennt man in fast allen Proben eine gegenläufige Entwicklung (siehe Abb. 41 und 42).

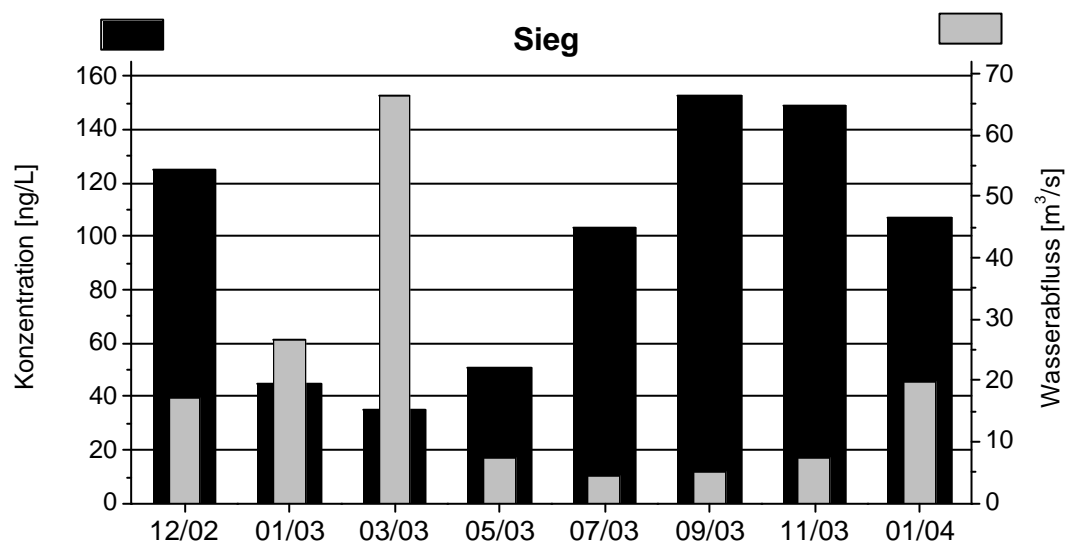


Abbildung 41: Darstellung der Antibiotikakonzentrationen (Summe von neun Antibiotika) [ng/L] und der Wasserabflussmengen [m³/s] der Sieg im Jahresverlauf

⁶⁸

Das LUA betreut die landeseigenen Gewässer und erhebt unter anderem zu jedem Zeitpunkt (mindestens in 15minütiger Auflösung) die Wasserabflussmengen der Flüsse an verschiedenen Pegelstandorten, so dass auch zu den Zeiten der Probenahme genaue Wasserabflussmengen von neun Flüssen erhalten werden konnten.

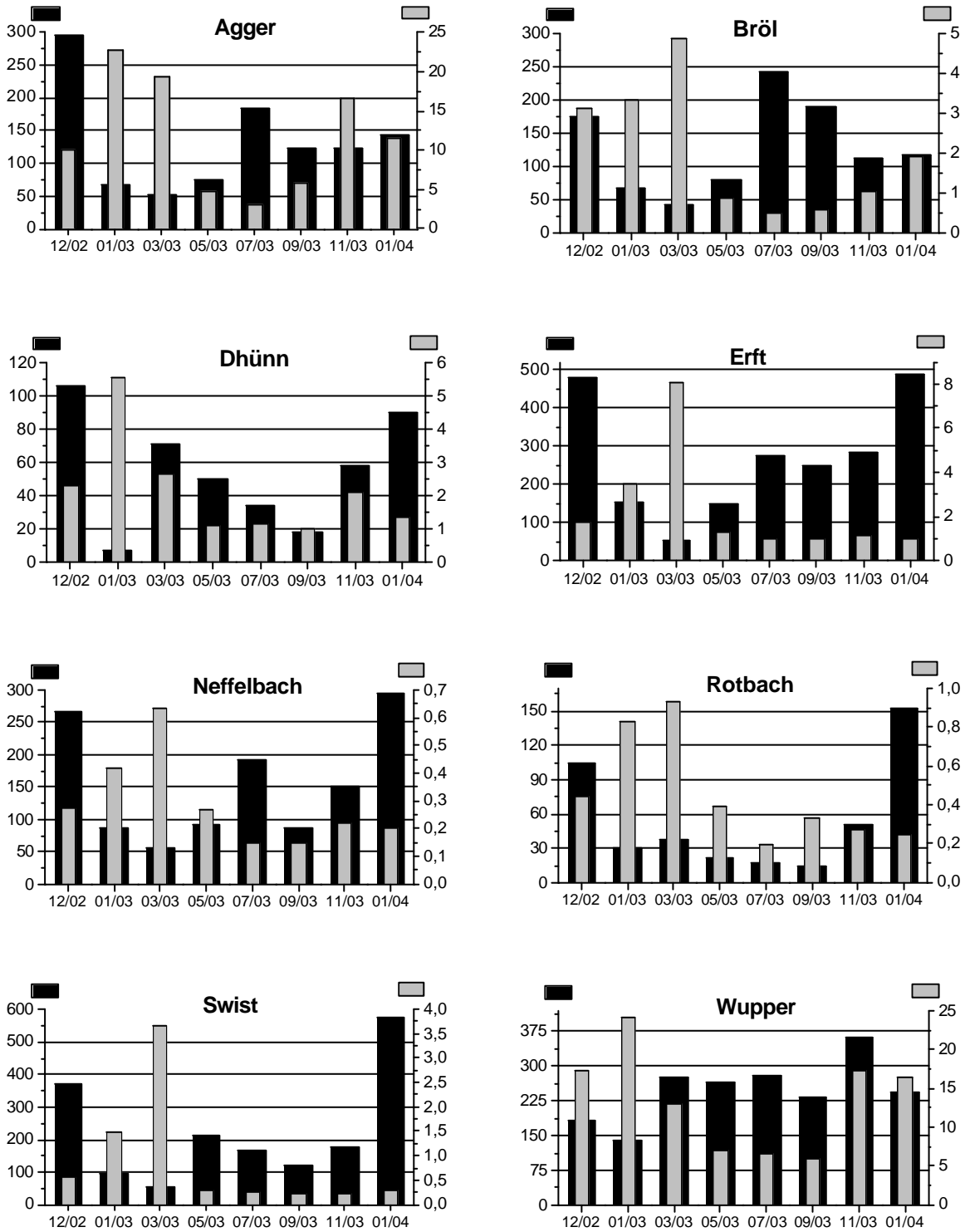


Abbildung 42: Darstellung der Antibiotikakonzentrationen (Summe von neun Antibiotika) [ng/L] und der Wasserabflussmengen [m³/s] von acht Flüssen im Jahresverlauf; die linke y-Achse gibt jeweils die Gesamtkonzentrationen an, an der rechten y-Achse sind die Wasserabflussmengen aufgetragen

Es ist erkennbar, dass zu Zeiten, an denen hohe Konzentrationen gemessen werden, die Abflusswerte sehr gering sind und dass bei niedrigen Konzentrationen besonders hohe Abflussmengen in den Flüssen vorliegen.

Man könnte zu der Schlussfolgerung kommen, dass die Konzentrationen in den Flüssen allein aufgrund der Schwankungen der Wasserabflussmengen in ihrer Höhe beeinflusst werden. Allerdings ist auch ein gewisser Einfluss der Verbrauchsunterschiede im Jahr auszumachen, wenn man sich die Gehalte im Januar 2004 ansieht. In einigen Gewässern waren die Summenkonzentrationen aus Januar 2004 die höchsten gemessenen, obwohl die Pegelstände und Wasserabflussmengen nicht geringer waren, als im Sommer zuvor. Außerdem ist in manchen Proben (Swist, Neffelbach, Rotbach, Dhünn, Erft) die Tendenz zu sehen, dass die Konzentrationen von September zum November und weiter zum Januar ansteigen, obwohl die Abflussmengen gleich geblieben, oder nur leicht gesunken sind. Dhünn, Agger und Wupper verzeichneten sogar Anstiege der Konzentrationen von September zum November, obwohl die Abflussmengen etwas gestiegen sind. Würde es sich um einen reinen Verdünnungseffekt eines annähernd konstanten Abwassers handeln, so dürften in diesen Fällen die Konzentrationen nicht ansteigen. Dass sie es dennoch tun, kann zwei Gründe haben:

- die Zusammensetzung des Abwasser ist nicht konstant innerhalb des Jahres und unterliegt gewissen Schwankungen, bedingt durch unterschiedliche Verschreibungszahlen von Antibiotika im Winter und im Sommer
- während der Wintermonate ist der Abbau der Antibiotika innerhalb der Kläranlage und der weitere Abbau in den Gewässern nicht so effektiv wie in wärmeren Monaten; dies könnte dazu führen, dass zwar möglicherweise das kommunale Kläranlagenzulaufwasser im September und im November die gleichen Gehalte an Antibiotikarückständen hat, aber im Spätherbst im Ablaufwasser höhere Konzentrationen als im wärmeren September vorliegen.

Wahrscheinlich ist aber, dass als Hauptgrund für die Unterschiede in den letzten Monaten des Jahres 2003 die Verschreibungssituation etwas anders war.

Einflussfaktoren

Insgesamt liegen drei Faktoren mit unterschiedlicher Gewichtung vor, die die Variationen der Konzentrationen in den Oberflächengewässern im Jahresverlauf beeinflussen. Dies sind die Wasserabflussmengen der Flüsse, der Verbrauch (bzw. die Verschreibungshäufigkeit) an

Antibiotika, sowie der Abbau der Rückstände (sowohl in Kläranlagen, als auch in den Gewässern selbst):

Von der Gewichtung her dürfte sich die Wasserabflussmenge am stärksten auswirken. Die Schwankungsbreite liegt in einem sehr weiten Bereich und kann innerhalb des Jahres einen Faktor von zehn betragen. Beispielsweise betrug die Wasserabflussmenge der Swist zum Probenahmezeitpunkt im September $0,207 \text{ m}^3/\text{s}$ und im März zuvor bei der Probenahme $3,653 \text{ m}^3/\text{s}$, also das 18fache davon. Ähnlich war das Ausmaß der Schwankung in der Sieg mit $4,294 \text{ m}^3/\text{s}$ im Juli und $66,606 \text{ m}^3/\text{s}$ im März (das 16fache)⁶⁹. Meist liegen die Faktoren im Vergleich der Abflussmengen zu den Probenahmezeitpunkten im Bereich von 5-10, am geringsten in der Wupper und im Neffelbach mit etwa 4. Dies bedeutet aber immerhin, dass die 4 bis 18fache Menge an Wasser in den Flussbetten zu gewissen Zeiten fließen kann⁷⁰.

Zusätzlich zu diesen großen Variabilitäten in den Wasserflüssen, gibt es die Schwankung der Verbrauchsmengen innerhalb des Jahres. Dabei gibt es einen Grundbedarf an Antibiotika, dem ein erhöhter Verbrauch vor allem in den Wintermonaten gegenüber steht. Dieser erhöhte Verbrauch ist aber nicht konstant höher, oder auf einen bestimmten Punkt festzulegen. Hier kommt es auf die allgemeine Erkrankungssituation und die Infektions- bzw. Grippewellen an. In akuten Situationen dürften auch hier die Verschreibungszahlen ein Vielfaches der Verschreibungen in einem Sommer betragen.

Die unterschiedliche Abbaubarkeit der Stoffe innerhalb des Jahres dürfte sich geringer auswirken, als die Variation in den Verbrauchsmengen und den Wasserabflussmengen. Der Abbau von Substanzen geschieht zum einen auf mikrobiologischem Wege (meist durch enzymatische Vorgänge). Hierauf kann sich ein Temperaturunterschied (im Jahresverlauf in den Kläranlagenzuläufen bis $10 \text{ }^\circ\text{C}$, in Oberflächengewässern bis zu $20 \text{ }^\circ\text{C}$) auswirken. Ein Anstieg von $10 \text{ }^\circ\text{C}$ würde allerdings keine Verzehnfachung der enzymatischen Aktivität

⁶⁹

Diese Werte beziehen sich nur auf die Schwankungen zu den Probenahmezeitpunkten; innerhalb des Jahres liegen die Schwankungen aber noch höher: so war der niedrigste Abflusswert der Sieg (Pegel Eitorf) im Jahr 2003 $2,07 \text{ m}^3/\text{s}$ und der Höchstwert des Abflusses $393 \text{ m}^3/\text{s}$, also das fast zweihundertfache davon. Bei der Swist $0,168 \text{ m}^3/\text{s}$ bzw. $12,8 \text{ m}^3/\text{s}$, Rotbach $0,075$ bzw. $7,60 \text{ m}^3/\text{s}$, Wupper $4,62$ bzw. $116 \text{ m}^3/\text{s}$.

⁷⁰

Die Schwankungen der Wasserabflüsse sind im Untersuchungszeitraum vor allem zwischen Winter/Frühjahr und Sommer zu erkennen gewesen; sie können aber je nach Wettersituation während des ganzen Jahres auftreten, so bei Gewitterereignissen mit Starkregen im Sommer, als auch bei Herbst- oder Frühjahrshochwasser, oder längeren Trockenperioden im Winter.

bedeuten [59] und würde daher nicht zu einer solchen Verminderung der Konzentrationen führen, wie z.B. variierende Wasserabflussmengen. Zum anderen geschieht ein Abbau durch photoinduzierte Prozesse oder durch Adsorption an Feststoffe und Fällung im Kläranlagenprozess, die weniger temperaturabhängig sind. Daher hat der Jahreszeitunterschied insgesamt nur zum Teil Einfluss auf die Abbaubarkeit.

Die Konzentrationen in den Oberflächengewässern stellen sich somit als Funktion des Verbrauchs (abhängig vom Erkrankungszustand der Bevölkerung) mit gewissem Basiswert und der Wasserabflussmenge (abhängig von Regenereignissen und Trockenperioden) dar.

Innerhalb gewisser Zeiten, wie hier gesehen in Dezember 2002, Januar und März 2003, ist die Konzentration in den Flüssen am stärksten durch die unterschiedlichen Abflussmengen beeinflusst, wenn man davon ausgehen darf, dass die Konzentrationen in den Abwässern in einem ähnlichen Bereich liegen (siehe folgendes Kapitel 4.2.3.4 d). Dafür spricht auch, dass die Konzentrationen im Januar 2004 deutlich über den Konzentrationen von Januar 2003 lagen, aber gleichzeitig die Abflussmengen in gleichem Maße geringer waren, als ein Jahr zuvor (sogar der Faktor der Konzentrationsunterschiede und der Unterschiede der Abflussmengen ist nahezu gleich). Auch in den Sommermonaten (Mai, Juli und September) dürfte die Schwankung von der Verbrauchsseite eher geringer sein und die Konzentrationen eher durch die unterschiedlichen Pegelstände beeinflusst sein. Dann gilt: je geringer die Wasserabflussmengen (Pegelstände), desto höher die Konzentrationen, und umgekehrt: je höher die Wasserabflussmengen (Pegelstände), desto geringer die Konzentrationen. Sind bei gleichen Pegelständen allerdings große Unterschiede in den Konzentrationen festzustellen (z.B. von September 2003 bis Januar 2004), so dürfte dies vorwiegend durch die Verbrauchsseite begründet sein.

c) Abwasseranteile in Oberflächengewässern

Im Kapitel zuvor wurde verdeutlicht, dass die Konzentrationen in den Oberflächengewässern zu einem großen Anteil durch die Wasserabflussmengen bestimmt wurden und somit durch den prozentualen Anteil von Abwasser in den Flüssen und Bächen. Zu Zeiten des Hochwassers war der Gehalt an Abwasser relativ niedrig, in der trockenen Sommerperiode hingegen vergleichsweise hoch.

Um den genauen Anteil zu den Probenahmeterminen zu bestimmen, ist es nötig einerseits die Abflussmengen der Gewässer zu haben und andererseits die Volumina der Abwasserleitungen. Die Abflussdaten lagen durch die ständigen Erhebungen (des LUA) an den Pegelstandorten zur Verfügung. Einleitungsmengen der kommunalen Kläranlagen zu erhalten ist jedoch nur sehr schwer möglich. Aufgrund der Bevölkerungszahlen innerhalb eines Einzugsgebietes ist jedoch eine Abschätzung der Abwassermengen durchaus möglich. Dazu muss nur bekannt sein, wie viele Einwohner an die jeweiligen Kläranlagen angeschlossen sind und in welche Gewässer diese Kläranlagen die Abwässer einleiten. Solche Zahlen sind aus dem Bericht über die „Entwicklung und den Stand der Abwasserbeseitigung in Nordrhein-Westfalen“ des MUNLV-NRW⁷¹ [159] zu entnehmen. Im Schnitt verbraucht jeder Bundesbürger ca. 150 L Wasser pro Tag [85] (in manchen Erhebungen wird in Europa von einem Verbrauch von 200 L/d ausgegangen [91, 120]). So unterschiedlich dieses Wasser auch genutzt wird, so gelangt es doch (mit Ausnahme eines Anteils zur Bewässerung) in die Kanalisation und wird den Kläranlagen zugeleitet. Dort behandelt, geschieht die Einleitung des gleichen Volumens in die Vorfluter und die Oberflächengewässer. Die Einleitung enthält zwar auch Regenwasser oder Wasser von versiegelten Flächen, sofern das System einer Mischkanalisation vorliegt, aber das Volumen des häuslichen Abwassers kann als nahezu konstant mit 150 L pro Person und Tag angesehen werden. Daher kann errechnet werden, wie viel geklärtes Abwasser der anliegenden Einwohner pro Tag in die Gewässer gelangt und wie hoch der prozentuale Anteil des Abwassers in den Gewässern jeweils war (siehe Tab. 32).

Durch Korrelation der gefundenen Konzentrationen mit dem Abwasseranteil kann einerseits möglicherweise dargestellt werden, wie die Entwicklung eines Gewässers im Jahresverlauf beeinflusst wird, und andererseits, ob die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gewässern auch auf die unterschiedlichen Abwasseranteile zurückzuführen sind.

⁷¹ MUNLV-NRW

Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen

Tabelle 32: *Prozentuale Anteile von Abwasser zu den Probenahmezeitpunkten in Oberflächengewässern im Raum Köln-Bonn von Dezember 2002 bis Januar 2004*

Gewässer (Einwohner)*	12/02	01/03	03/03	05/03	07/03	09/03	11/03	01/04
Agger (273436)	5	2	3	10	15	8	3	4
Bröl (57051)	3	3	2	11	21	17	10	5
Dhünn (27546)	2	1	2	4	4	5	2	4
Erft (231160)	23	12	5	31	40	42	36	42
Neffelbach (20243)	12	8	5	13	22	22	18	17
Rotbach (18618)	7	4	4	8	17	10	12	13
Sieg (445143)	5	3	1	11	18	16	11	4
Swist (85181)	27	10	4	53	60	71	64	51
Wupper (777853)	8	6	10	19	21	23	8	8

* Einwohner, deren Abwasser vor der Probenahmestelle über die Kläranlagen in das jeweilige Gewässer eingeleitet wird

Man erkennt anhand der Tabelle 32, dass die Abwasseranteile im Januar und März 2003 deutlich unter denen der anderen Monate lagen. Außerdem stechen besonders die Proben von Juli bis November heraus, in denen Gehalte von bis zu 70 Prozent in den Gewässern vorkamen. Von einem Verdünnungseffekt auf das Abwasser kann da kaum mehr gesprochen werden. Des Weiteren ist ersichtlich, warum manche Gewässer recht hohe Gehalte an Antibiotika enthielten und andere nur geringe Konzentrationen aufwiesen (vergleiche Tab. 30 und Abb. 39 a, b). Die höchsten Gehalte wiesen Wupper, Erft, Swist und Neffelbach (etwas weniger Bröl, Agger und Sieg) auf, also die Flüsse, die auch die höchsten prozentualen Anteile an Abwasser enthielten. Dhünn und Rotbach, mit vergleichsweise geringen Summenkonzentrationen, wiesen geringere Abwasseranteile auf, als die anderen Flüsse.

Auch innerhalb der einzelnen Flüsse ist die Beeinflussung der Konzentrationen durch die Abwasseranteile erkennbar (siehe Abb. 43 und 44).

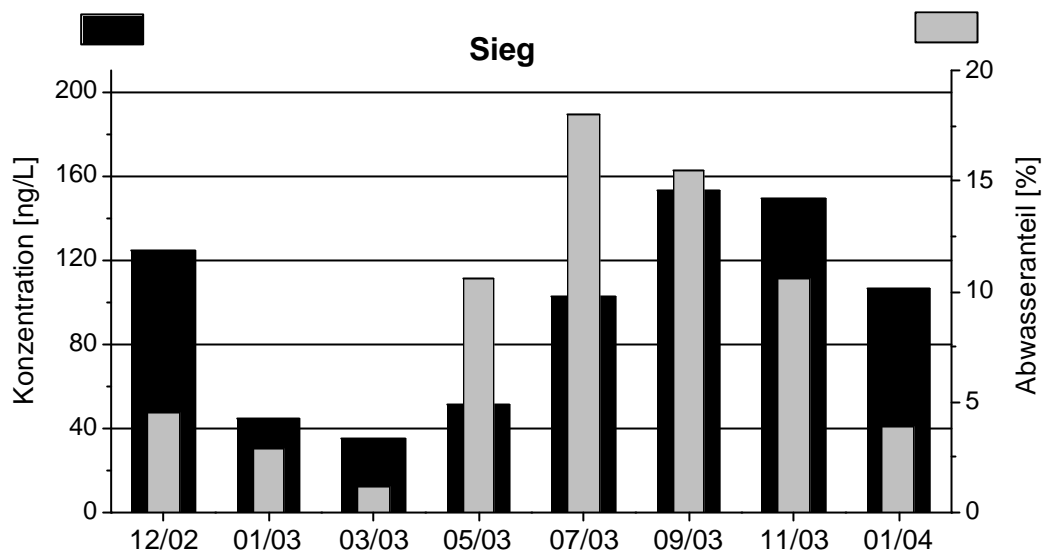
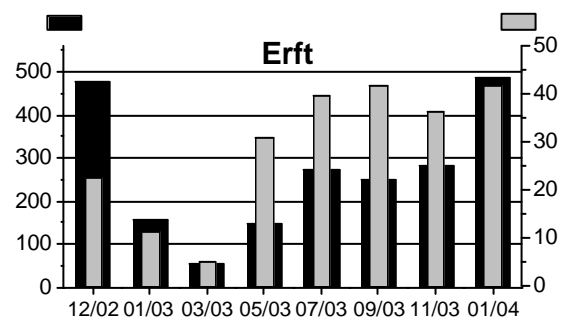
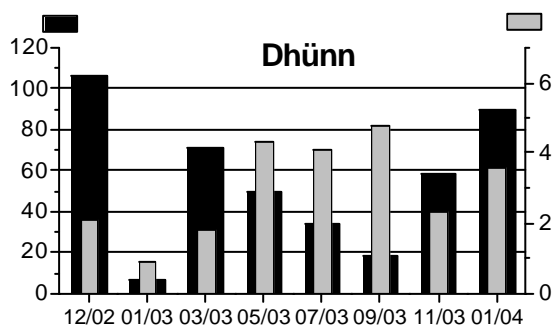
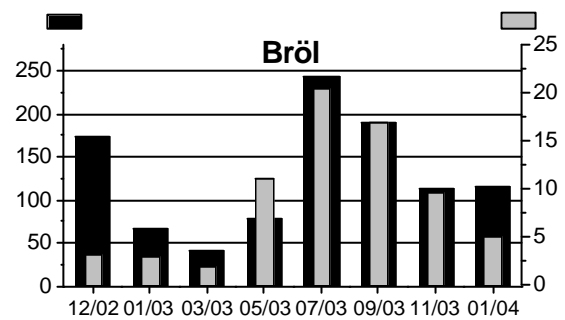
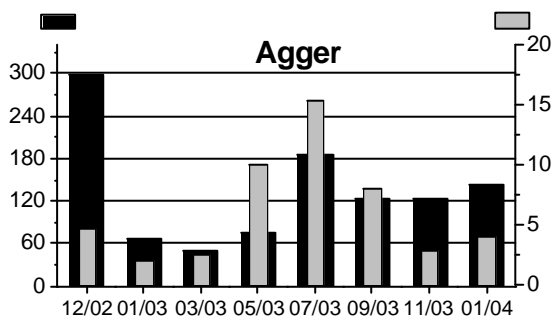


Abbildung 43: Darstellung der Summenkonzentrationen von neun Antibiotika [ng/L] und des Abwasseranteiles [%] der Sieg zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt



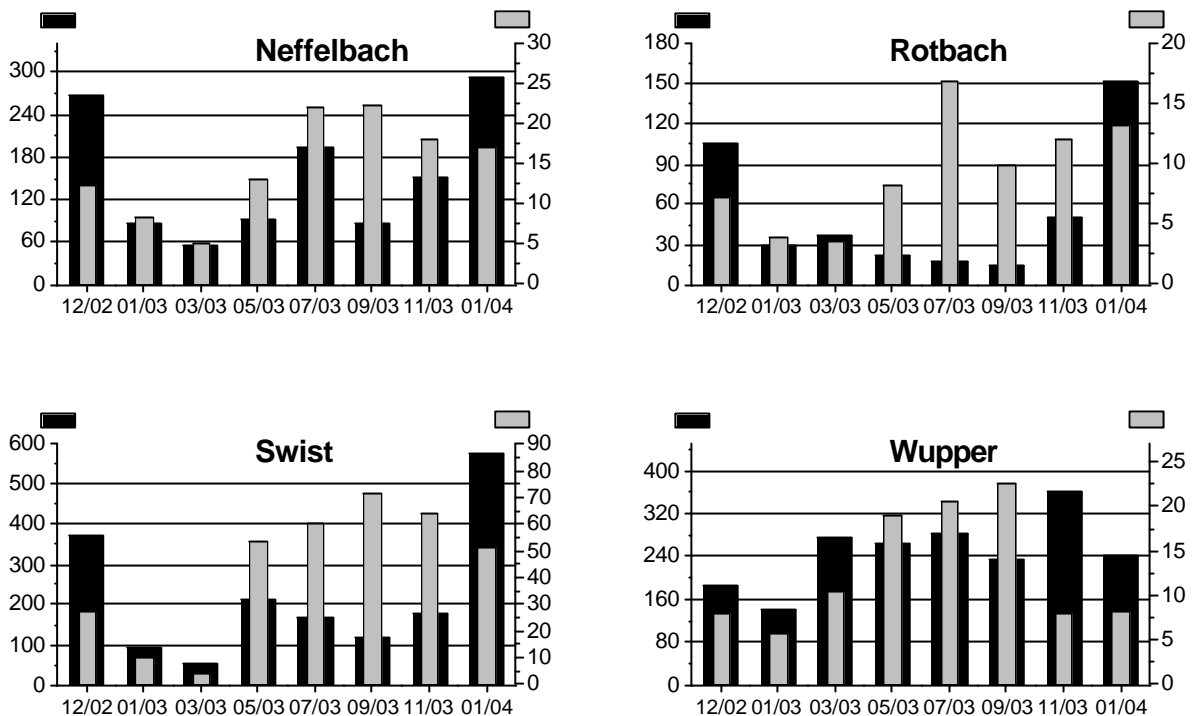


Abbildung 44: *Darstellung der Antibiotikakonzentration (Summe von neun Antibiotika) [ng/L] und des Abwasseranteiles [%] in acht Flüssen zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt; die linke y-Achse gibt jeweils die Gesamtkonzentrationen an, an der rechten y-Achse sind die Abwasseranteile aufgetragen*

Teilweise lässt sich sehr deutlich die Korrelation erkennen, die umgekehrt auch schon in der Darstellung der Abbildungen 41 und 42 zwischen den Gesamtkonzentrationen und dem Wasserabfluss zu erkennen war. Vor allem in den ersten fünf Probenahmeterminen ist die Korrelation gut möglich (hohe Abwasseranteile führen zu hohen Konzentrationen, geringe Abwasseranteile zu niedrigen Konzentrationen). Die Entwicklung der Konzentrationen zwischen September 2003 und Januar 2004 ist nur in ein paar der Gewässer primär auf den Anteil an Abwasser zurückzuführen (Sieg, Agger, Bröl, z.T. Dhünn). In anderen Gewässern (Erft, Neffelbach, Swist, Wupper) zeigen die Konzentrationen in Bezug zum Abwasseranteil (zwischen Sept. 03 und Jan. 04) sogar mitunter gegenläufige Tendenzen. Dies liegt dann daran, dass die Antibiotikakonzentrationen in den Abwässern in diesen Monaten angestiegen sind. Wenn die Antibiotikakonzentrationen im Abwasser in einem stärkeren Maße sich erhöhen, als die Wasserabflussmengen steigen (bzw. die Abwasseranteile sinken), so erhält

man auch höhere Konzentrationen in den Oberflächengewässern. Bedeutender in den resultierenden Konzentrationen ist dies noch, wenn die Abwasseranteile annähernd gleich bleiben, da die Wasserabflussmengen und Pegelstände gleich sind, und die Gehalte an Antibiotikarückständen im Abwasser sich erhöhen. Dann hat man die Korrelation mit der Verbrauchsseite, nämlich wenn die Konzentrationen in den Oberflächengewässern sich proportional zu den Gehalten im Abwasser zeigen.

Da der Effekt der Wasserabflussmengen als beeinflussender Faktor aber meist am stärksten ist, wird eine Veränderung der Konzentrationen im Abwasser oft kaschiert und ist nur in bestimmten Fällen sichtbar. Jedenfalls war im Versuchszeitraum vor allem die Korrelation mit den Abwasseranteilen gewichtiger und zumindest in den ersten fünf Probemonaten in fast allen Flüssen zu erkennen. Für viele Flussgebiete lässt sich daher folgern: je höher der Abwasseranteil in einem Gewässer, desto höher sind die Antibiotikakonzentrationen darin.

Eine weitere Bestätigung findet diese These in folgender Korrelation: es wird dazu angenommen, dass sich das Abwasser der verschiedenen Regionen des Großraumes Köln-Bonn in dem gleichen Monat nicht besonders unterscheidet. Dies ist insofern auch anzunehmen, da der Erkrankungszustand im Mai in einer Teilregion wohl ähnlich sein dürfte, wie in einer anderen. Dass sich ein Mai von einem Januar unterscheidet, konnte ja schon an den vorherigen Beziehungen (Konzentration zu Wasserabfluss und Konzentration zu Abwasseranteil) in einzelnen Gewässern erkannt werden. Deshalb soll hier gezeigt werden, dass sich innerhalb eines Monats (Mai bzw. Januar) durchaus auch die Konzentrationen in den verschiedenen Gewässern mit den Abwasseranteilen korrelieren lassen (siehe Abb. 45 a und b).

Die Korrelationskoeffizienten, die man erhält, zeigen deutlich, dass es möglich ist, die Unterschiede der Flüsse, was die Konzentrationen an Antibiotika anbelangt, in Verbindung mit den verschiedenen Abwasseranteilen zu bringen. Recht hohe Koeffizienten von R^2 über 0,9 lassen sich in den beiden dargestellten Monaten für die Summe der neun Antibiotika erhalten. Aber auch bei den einzelnen Substanzen sieht man für CLI, ERY und SMX Koeffizienten von 0,6 bis 0,9 (siehe Abb. 45). Lediglich für Trimethoprim liegen im Januar nur sehr geringe Korrelationskoeffizienten vor. Dies hängt aber mit den niedrigen Konzentrationen zusammen, die natürlich einen gewissen Fehler beinhalten, bzw. bei denen sich kleine Fehler schon stärker auswirken können.

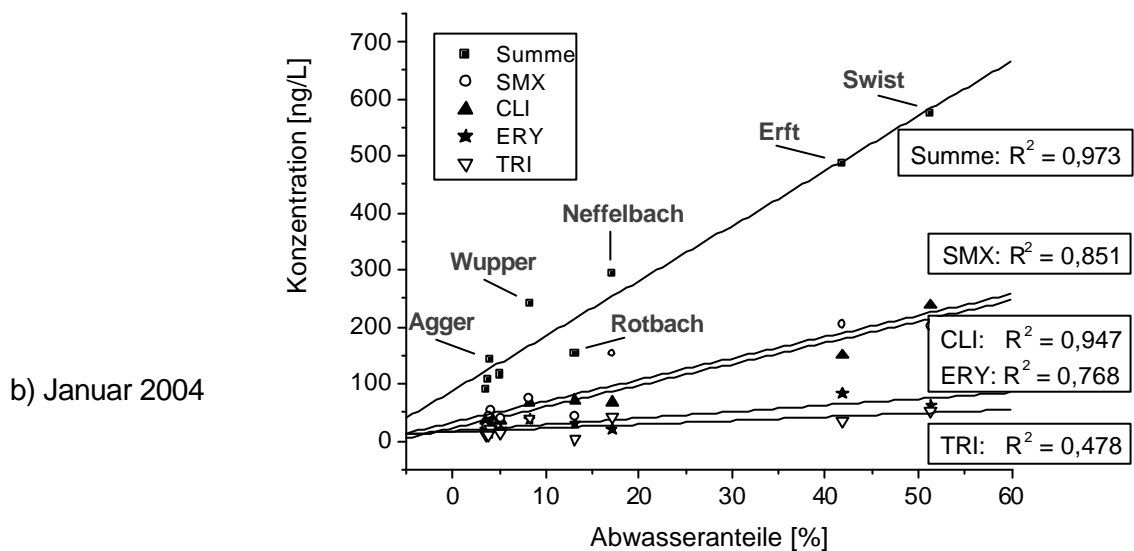
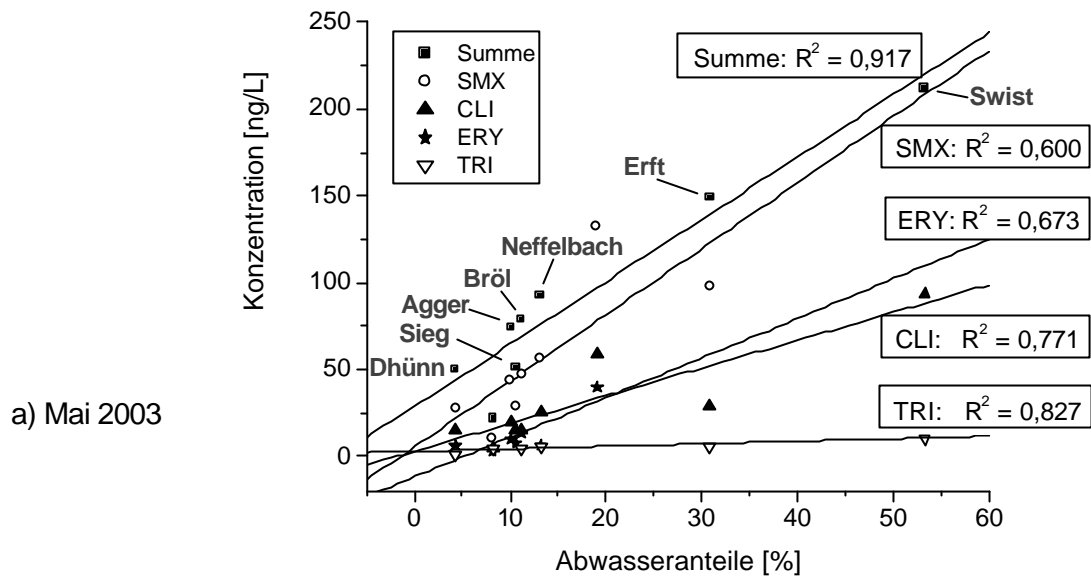


Abbildung 45: Korrelation zwischen Summenkonzentrationen, Konzentrationen an Clindamycin, Erythromycin, Sulfamethoxazol und Trimethoprim in verschiedenen Gewässern im Großraum Köln-Bonn mit den jeweiligen Abwasseranteilen in den Gewässern im Mai 2003 (oben) und Januar 2004 (unten), Angabe der Korrelationskoeffizienten, beispielhaft Angabe mancher Gewässer

Trotz der unterschiedlichen Verhältnisse in den einzelnen Gewässern und den Bedingungen, die dort vorherrschen und welche Einfluss auf die Rückstandsgehalte haben (unterschiedliche Keimspektren, Gewässertemperaturen, Schwebstoffanteile, etc.) kann dennoch erkannt werden, dass für die Konzentrationen hauptsächlich der Anteil an Abwasser in den Gewässern verantwortlich ist.

Es kann also einerseits gezeigt werden, dass innerhalb eines Gewässers die Beziehung gilt, dass die Umweltkonzentrationen umso höher sind, je höher der Abwasseranteil ist, und andererseits, dass diese These auch grundsätzlich zur Charakterisierung der verschiedenen Gewässer anzuwenden ist. Der Abwasseranteil ist daher der Grund, warum in einem Gewässer höhere Konzentrationen auftreten als in einem anderen.

Hier in diesen Ausführungen wurde der Abwasseranteil ausgehend von den in einem Einzugsgebiet lebenden Personen berechnet und basierte auf einem mittleren Abwasservolumen von 150 L pro Einwohner. Üblicherweise wird statt eines genauen Abwasseranteiles, der hier kalkuliert wurde, die Konzentration an Bor als Indikator für kommunales Abwasser verwendet. Dafür ist jedoch mit jeder Probenahme auch die Bestimmung von Bor in den Wasserproben notwendig. Im BLAC-Bericht [85] wurden Konzentrationen von Arzneistoffen in Beziehung zu den Borgehalten gesetzt, woraus sich Korrelationen ergaben, die zwischen 0,5 und 0,8 lagen und als „Indiz für das Abwasser als maßgebliche Eintragsquelle“ betrachtet wurden. Da die Korrelationen hier zum Teil noch höher liegen, kann das angewandte Verfahren zur Berechnung des Abwasseranteiles durchaus als legitim angesehen werden. Mit den konkreten Berechnungen erhält man einen noch genaueren direkten Hinweis auf die Beziehung zwischen Konzentrationen und Abwasseranteil.

d) Konzentrationen von Antibiotika in Kläranlagenabläufen

Es wurde erkannt, dass der unterschiedliche Anteil an Abwasser in den Oberflächengewässern zu unterschiedlich hohen Konzentrationen innerhalb eines Flusses im Jahresverlauf führt. Des Weiteren zeigte sich, egal ob große oder kleine Flüsse und Bäche, dass der Abwasseranteil verantwortlich dafür ist, dass die Gewässer in ihren Antibiotikagehalten verschieden sind.

Dabei wurden Gewässer aus einem relativ großen Gebiet miteinander verglichen und in Beziehung zu dem Anteil an kommunal gebrauchtem Wasser gesetzt. Mit der hohen Korrelation tritt die Vermutung auf den Plan, dass sich auch die Abwässer an sich nicht besonders voneinander unterscheiden. Vielmehr, dass sie, egal ob aus dem Erftkreis, dem Rhein-Sieg-Kreis, dem Kreis Düren, den Städten Köln, Bonn oder Leverkusen stammend, sehr ähnliche Gehalte und Zusammensetzungen an Antibiotika aufweisen. Schon zuvor im Gewässerscreening (Kap. 4.2.3.2 d) wurde erkannt, dass eine Unterscheidung der Gewässer nach der Herkunftsregion nicht möglich war. Da auch in ländlichen Gegenden die üblichen Humanantibiotika vorherrschend waren, sollte auch das Abwasser der ländlichen und der urbanen Regionen von der selben Art sein.

Unter Zugrundelegung der Abwasseranteile in den Bächen und Flüssen lassen sich die theoretischen Abwasserkonzentrationen der Antibiotika ausrechnen (siehe Tab. 33).

Tabelle 33: *Theoretische Summenkonzentrationen von neun Antibiotika in Kläranlagenabwässern [$\mu\text{g/L}$], berechnet auf Grundlage der Abwasseranteile in den Gewässern zum Zeitpunkt der Probenahme*

Gewässer	Dez. 2002	Januar 2003	März 2003	Mai 2003
Agger	6,28	3,26	2,07	0,733
Bröl	5,47	2,24	2,07	0,706
Dhünn	5,11	0,809	3,94	1,16
Erft	2,09	1,35	1,06	0,483
Neffelbach	2,16	1,06	1,10	0,707
Rotbach	1,45	0,769	1,06	0,269
Sieg	2,77	1,55	3,02	0,480
Swist	1,38	0,935	1,36	0,399
Wupper	2,35	2,49	2,65	1,39

	Juli 2003	September 2003	November 2003	Januar 2004
Agger	1,20	1,52	4,28	3,49
Bröl	1,18	1,12	1,17	2,25
Dhünn	0,829	0,380	2,52	2,51
Erf	0,685	0,593	0,778	1,17
Neffelbach	0,876	0,395	0,844	1,72
Rotbach	0,101	0,142	0,417	1,16
Sieg	0,572	0,988	1,40	2,75
Swist	0,281	0,167	0,274	1,12
Wupper	1,37	1,04	4,61	2,94

Entgegen der Erwartung sind die theoretischen Kläranlagenabläufe einander nicht alle so ähnlich. Besonders Agger, Dhünn und Wupper stechen mit höheren Gehalten manchmal etwas heraus. Relativ vergleichbar sind dagegen die Abwässer der Erf, des Neffelbaches, des Rotbaches, der Sieg und der Swist, wobei Abwasser in Rotbach und Swist im Sommer niedrigere Konzentrationen als die anderen Abflüsse aufweist.

Die Konzentrationen liegen in einem Bereich von 0,1 µg/L bis zu 6 µg/L als Summe von neun Antibiotika, wobei die Gehalte mitunter zu mehr als der Hälfte von einer einzigen Substanz (meist Sulfamethoxazol) bestimmt werden (siehe Tab. 34).

Tabelle 34: *Theoretische Konzentrationen von Sulfamethoxazol in Kläranlagenabwässern [µg/L], berechnet auf Grundlage der Abwasseranteile in den Gewässern zum Zeitpunkt der Probenahme*

Gewässer	Dez. 2002	Januar 2003	März 2003	Mai 2003
Agger	2,86	2,16	0,690	0,436
Bröl	2,04	1,14	0,493	0,420
Dhünn	2,46	0,809	0,833	0,650
Erf	0,819	0,627	0,301	0,318
Neffelbach	0,973	0,518	0,275	0,426
Rotbach	0,552	0,282	0,201	0,122
Sieg	1,86	1,27	0,689	0,273
Swist	0,572	0,362	0,346	0,171
Wupper	0,790	0,909	0,753	0,693

	Juli 2003	September 2003	November 2003	Januar 2004
Agger	0,663	1,03	1,65	1,32
Bröl	0,555	0,555	0,303	0,755
Dhünn	0,780	0,380	0,912	0,698
Ertf	0,401	0,445	0,412	0,487
Neffelbach	0,526	0,234	0,572	0,893
Rotbach	0,083	0,142	0,092	0,320
Sieg	0,383	0,659	0,612	1,13
Swist	0,128	0,098	0,126	0,391
Wupper	0,641	0,565	1,97	0,888

Verglichen mit den in Tab. 7, Kap. 2.8.1 abgeschätzten PEC für Kläranlagenabläufe liegen die Gehalte etwa in dem erwarteten Bereich. Dass es dennoch zu gewissen Abweichungen kommt, liegt daran, dass zum einen die Annahme gemacht wurde, dass 150 L Abwasser pro Person täglich anfallen. Auf diesen Wert hin wurden die Konzentrationen berechnet. Würde allerdings in einem gewissen Gebiet eine höhere Menge an Abwasser anfallen, so ergäben sich dann in dem theoretischen Abwasser geringere Konzentrationen. Zum anderen kommen Abweichungen besonders dadurch zustande, dass der Wert der PEC_{KA-Ab} auf der Gesamtjahresmenge an verschriebenen Antibiotika beruht. Jahreszeitliche Unterschiede sind in dem Wert nicht enthalten.

In dem PEC-Wert wurde ebenfalls nicht berücksichtigt, dass ein Teil der verschriebenen Medikamente gar nicht tatsächlich eingenommen wird und somit nicht unbedingt in den Abwasserpfad gelangt, sondern über den Hausmüll entsorgt wird. Dieser Anteil ist jedoch kaum zu quantifizieren. Schätzungen gehen davon aus, dass nur bis zu 30 % der Medikamente nach Vorschrift des Arztes eingenommen werden [1]. Der Großteil wird entweder absichtlich nicht eingenommen oder in geringerer Dosierung, bzw. wird nach dem Feststellen einer vermeintlichen Besserung der gesundheitlichen Lage auf eigenes Ermessen hin von der Anwendungsmenge reduziert. Dazu kommt noch, dass zwar bestimmte Packungsgrößen verschrieben werden, diese aber nach der Anweisung des Arztes gar nicht komplett aufgebraucht werden müssen. In den Verschreibungszahlen gemäß Arzneiverordnungsreport werden jedoch nur die verschriebenen DDD aufgrund der kompletten Packungen erfasst. Plant man all diese Unwägbarkeiten in seine Vorhersage mit ein, so stellt man anhand der hier angegebenen theoretischen Abwasserkonzentrationen fest, dass die Werte gut übereinstimmen.

Sieht man die theoretischen Abwasserwerte an, so erkennt man, dass die Spitzengehalte ausschließlich in den Wintermonaten erhalten werden. Die Minimalkonzentrationen von bis

zu 100 ng/L hingegen treten lediglich im Sommer in Erscheinung. Aber auch in den Sommermonaten gibt es große Abweichungen zwischen den verschiedenen Abwässern. Sind in manchen die Konzentrationen im Bereich bis 0,5 µg/L als Summe, so zeigen andere Gehalte von bis zu 1,5 µg/L. Ebenso in Wintermonaten gibt es Differenzen, die das 45fache mancher Gehalte ausmachen (im November zwischen Swist und Wupper sogar das 16fache). Solche Unterschiede können wieder (wie oben zur Abweichung vom PEC beschrieben) zum Teil daher kommen, dass die Personen in manchen Flusseinzugsgebieten durchschnittlich mehr oder weniger Abwasser produzieren, als die zur Berechnung verwendeten 150 L, woraus dann auch andere Abwasser-Konzentrationen resultieren, als die hier angegebenen. Weitere Gründe, sowie die Hauptursache für solche Differenzen werden im übernächsten Unterkapitel vorgestellt (Kap. 4.2.3.4 f). Eine Abhängigkeit der Gehalte von dem Einzugsgebiet ist auch hier nicht festzustellen, da Abwässer in gering besiedelten Gebieten ähnliche Gehalte, wie in dichter besiedelten haben. Anhand des Abwassers sollte eine solche Feststellung auch gar nicht zu machen sein, da die Gehalte in einem Abwasser nicht durch die Siedlungsdichte, sondern nur durch das Volumen an verbrauchtem Wasser pro Person, die Verschreibungshäufigkeit und die Kläranlagenleistung beeinflusst werden.

Einfluss der Verschreibungsmengen

Was aber an den Abwasserkonzentrationen sehr wohl festzustellen ist, ist der weitere wichtige Faktor, der neben den Wasserabflussmengen die Umweltkonzentrationen beeinflusst, nämlich die Verbrauchsseite mit den Verschreibungsmengen. In allen Gewässern ist zu sehen, dass die Konzentrationen im Abwasser im Winter relativ hoch sind, zum Sommer abfallen, in dessen Monaten dann die geringsten Werte ergeben und zum Herbst und Winter hin wieder ansteigen. Da der Faktor der Wasserabflussmengen hier herausgerechnet ist, wird die Verbrauchsseite nun deutlich. Man erkennt, dass es eine Abhängigkeit der Umweltgehalte von der Verschreibungshäufigkeit gibt und dass der Hauptteil der Verschreibung im Winterhalbjahr zu verzeichnen ist. Bisher waren solche Effekte verdeckt durch die starken Schwankungen der Pegelstände. Aber wie anhand der Zahlen ersichtlich, hat die saisonabhängige Verschreibung einen großen Einfluss auf die Abwasserkonzentrationen. Daher waren in den Monaten November, Dezember und Januar die höchsten theoretischen Konzentrationen zu finden. In den Sommermonaten wurden die Gehalte eher durch den grundsätzlichen Basisbedarf an Antibiotika bestimmt und weniger durch die massenhafte Verschreibung zur Erkältungs- und Grippebehandlung, die eher zwischen November und Februar (zum Teil auch noch März) zu erhöhten Gehalten führte. Daher resultierten in den

Sommermonaten nur Gehalte, die die Hälfte oder zum Teil auch nur ein Zehntel der Wintergehalte betragen.

Die Beobachtung, dass vor allem im Winterhalbjahr ein vermehrter Eintrag von Antibiotika in das Abwasser erfolgt, war sowohl anhand der Gesamtkonzentrationen als Summe von neun Antibiotika zu machen (siehe Tab. 33), als auch an den Einzelkonzentrationen, wie am Beispiel des Sulfamethoxazols in Tab. 34 erkennbar war. Ein ähnliches Bild lieferten auch Clindamycin und Erythromycin. Es wäre durchaus denkbar gewesen, dass manche Antibiotika innerhalb des gesamten Jahres eine nahezu gleichbleibende Eintragungssituation feststellen lassen. Und zwar wäre dies bei der Anwendung bei nicht saisonal bedingten Erkrankungen möglich, also z.B. bei der Behandlung von Infektionen der Augen, Ohren, Gelenke, der Harnwege, der Geschlechtsorgane, oder von äußerlichen Entzündungen. Die hier untersuchten Substanzen, die häufig in den Gewässern gefunden werden konnten, werden jedoch sowohl zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen aller Art eingesetzt, als auch zur Bekämpfung von Infektionen der Atemwege, des Hals-Nasen-Ohren-Bereiches, der oberen und unteren Luftwege oder bei Lungenentzündungen, und somit bei Krankheiten, die häufiger im Winterhalbjahr auftreten. Diese jahreszeitliche Entwicklung lässt sich also folglich nicht nur bei der Summe der Antibiotika, sondern auch anhand der hier untersuchten einzelnen Substanzen beobachten.

Ferner ist der Verlauf im Jahr nicht nur in einzelnen Flussgebieten als singuläres Phänomen erkennbar, sondern in allen Oberflächengewässern, die anthropogen durch kommunale Abwässer beeinflusst sind und von denen Abflussmengen und Zahlen der anliegenden Einwohner vorlagen (siehe Abb. 46).

An Abbildung 46 ist deutlich zu erkennen, wie ähnlich doch die Konzentrationen innerhalb der Sommermonate sind und, dass in vielen der Abwässer in den Flüssen und Bächen ein Anstieg der Konzentrationen zum November und zum Januar hin erfolgt, während die Konzentrationen vom Winter und Frühjahr zum Sommer kontinuierlich abfallen⁷².

In den Abbildungen 47 a und b sind detailliert die Variationen in den einzelnen Flüssen dargestellt.

⁷²

Die gestrichelten Linien sollen den Verlauf der Konzentrationen in der Jahresentwicklung verdeutlichen, wohlwissend, dass eine direkte Verbindung der Datenpunkte von acht Probenahmeterminen nicht guter wissenschaftlicher Praxis entspricht.

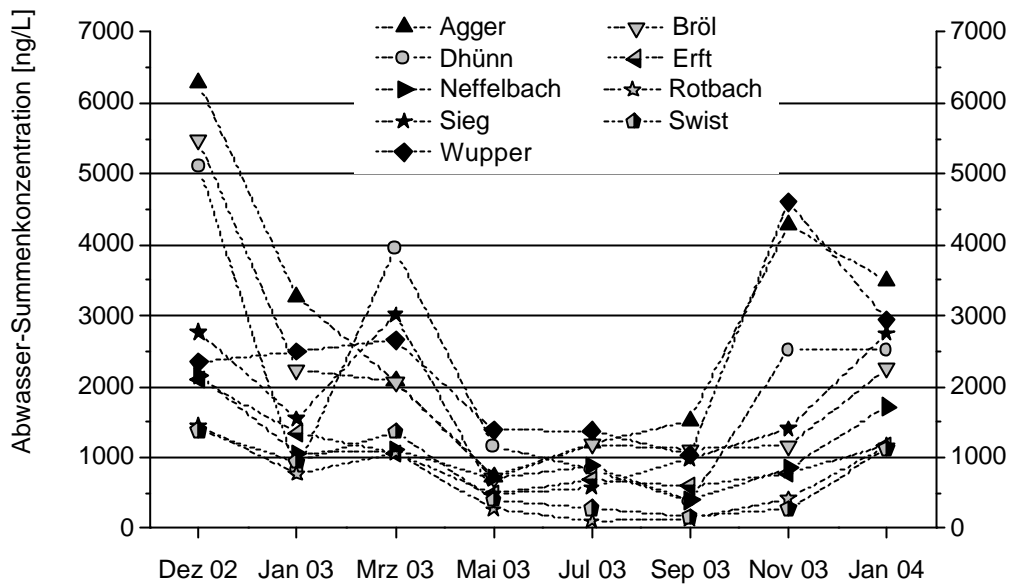
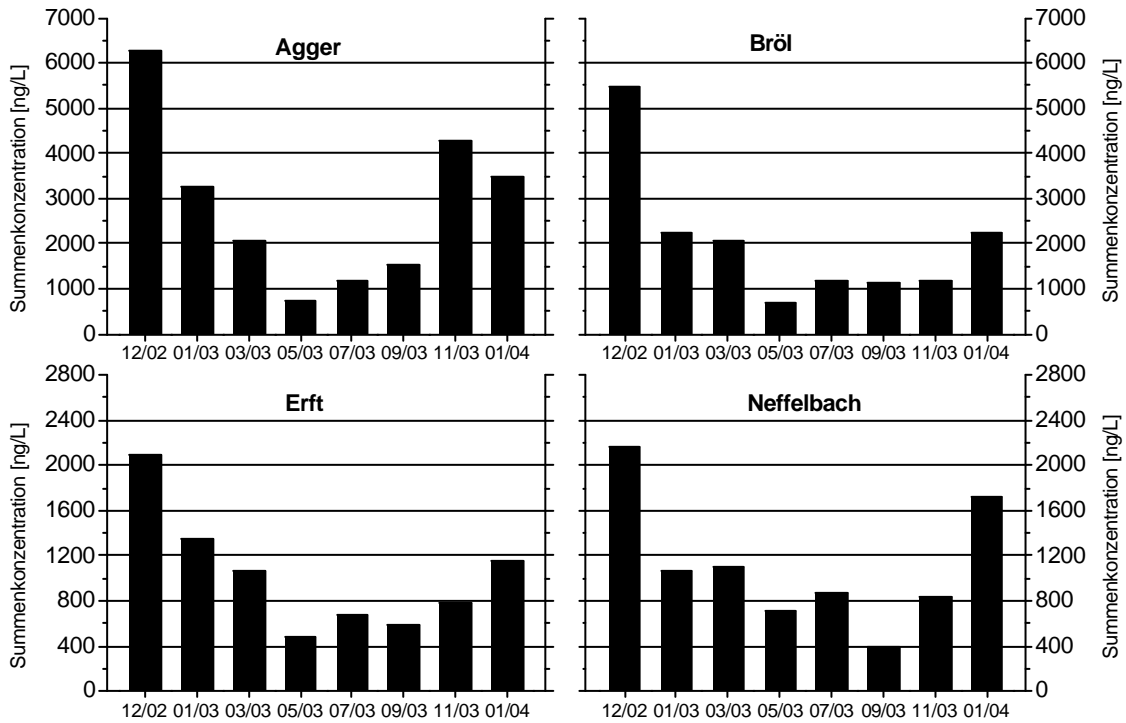


Abbildung 46: Variation der berechneten theoretischen Abwasserkonzentrationen, als Summe von neun Antibiotika [ng/L] in neun verschiedenen Flüssen Nordrhein-Westfalens innerhalb des Jahresverlaufes



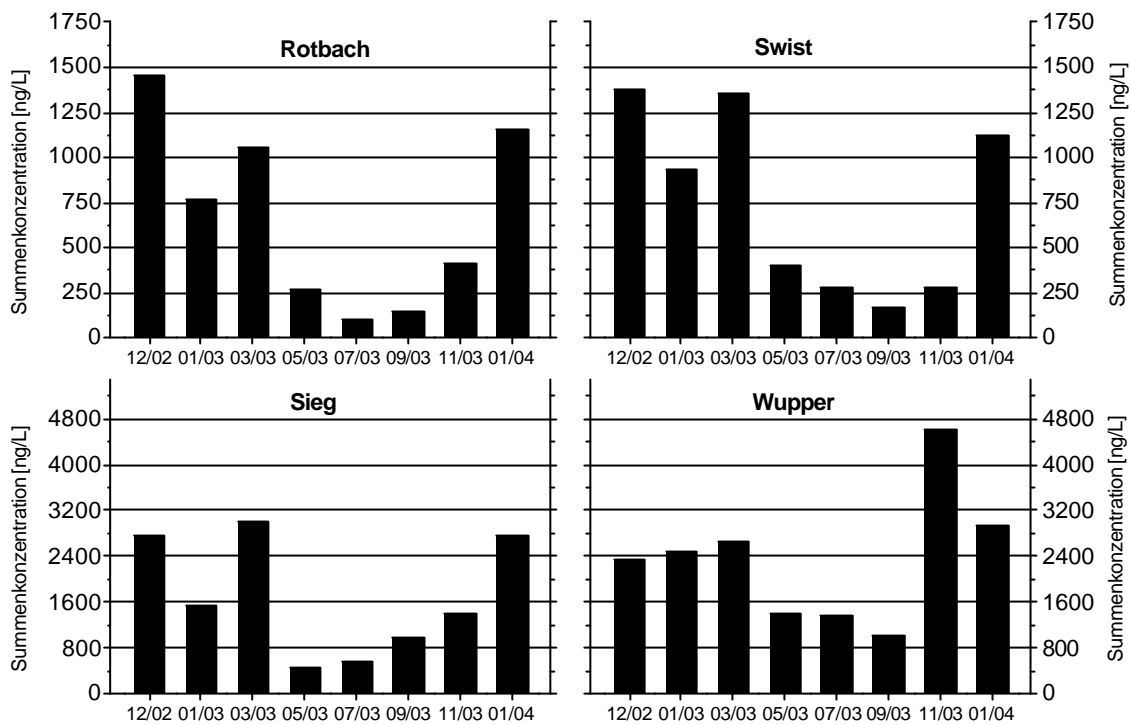


Abbildung 47 a, b: *Entwicklung der Summenkonzentrationen [ng/L] von neun Antibiotika in berechneten theoretischen Abwässern in den Einzugsgebieten von jeweils vier Einzelgewässern aus dem Großraum Köln-Bonn innerhalb der Zeit von Dezember 2002 bis Januar 2004*

Auch in den Untersuchungen im BLAC-Bericht wurde für manche Arzneimittel eine saisonabhängige Variation der Konzentrationen in Kläranlagenabläufen festgestellt [85]. Dabei handelte es sich zwar um Wirkstoffe aus Hustenmitteln und Nasensprays und nicht um Antibiotika, aber ebenfalls Stoffe, die besonders in der Winterzeit zur Anwendung gelangen. Die höchsten Konzentrationen konnten in den Monaten November bis März gefunden werden, mit Spitzen im Januar und Februar. Zum Frühjahr und Sommer sanken die Konzentrationen ebenfalls deutlich ab und stiegen im nächsten November wieder an. Die Konzentrationen im Frühjahr wurden dabei neben der Behandlung von Erkältungen und Grippe auf die Anwendung bei Allergikern zurückgeführt, ein kleiner Anstieg im Sommer auf die Sommergrippe. Auch wenn hier in den Untersuchungen im Sommer kein Anstieg zu verzeichnen war, so konnten die gleichen Tendenzen jedoch sehr wohl auch anhand der Antibiotika erkannt werden, wobei darauf hingewiesen werden soll, dass in den Untersuchungen die Konzentrationen in den Oberflächengewässern bestimmt wurden, also

nicht in der Matrix Abwasser selbst (dazu siehe Kap. 4.2.2), und dass nur die intakten Ursprungssubstanzen nachgewiesen wurden und nicht die Metaboliten (Ausnahme Erythromycin). Dennoch können, auch noch nach den Abbauschritten, denen die Stoffe im Körper und in der Kläranlage unterliegen, die Umweltzusammenhänge und die Verbrauchsgewohnheiten anhand der Umweltkonzentrationen sehr treffend erkannt werden.

e) Ermittlung der Frachten in den Gewässern

Bisher sind die jahreszeitlichen Unterschiede nur anhand der Kalkulationen in den berechneten theoretischen Abwässern in den Flussgebieten bestimmt worden. Dabei wurde die vorherige Annahme verwendet, dass die Abwasservolumina pro Person fix sind, bzw. in den verschiedenen Gebieten nicht sonderlich variieren. Es kann aber sein, dass die Abwassermengen pro Person und Tag nicht nur zwischen den verschiedenen Gebieten variieren und einen Vergleich schwierig machen, sondern, dass sie auch innerhalb des Jahres nicht konstant sind, da möglicherweise im Sommer mehr Wasser verbraucht wird. Um unabhängig von diesen Abwassermengen zu genaueren Aussagen bezüglich des verbrauchsabhängigen Auftretens von Antibiotika in der Umwelt zu kommen, können die Frachten auf Basis der Konzentrationen und der Wasserabflussmengen berechnet werden. Dadurch kann man die innerhalb eines Tages mit einem Gewässer abfließenden Mengen an Antibiotika abschätzen und mit den Frachten an den anderen Probenahmetagen vergleichen oder mit den Frachten in anderen Gebieten (siehe Tab. 35).

Table 35: *Tagesfrachten der Summe von neun Antibiotika [g] in neun Oberflächengewässern im Großraum Köln-Bonn in der Zeit von Dezember 2002 bis Januar 2004*

Gewässer	Dez. 2002	Januar 2003	März 2003	Mai 2003
Agger	258	134	84,9	30,1
Bröl	46,8	19,2	17,7	6,05
Dhünn	21,1	3,34	16,3	4,80
Ertf	72,1	49,5	39,0	17,1
Neffelbach	6,55	3,22	3,34	2,15
Rotbach	4,05	2,15	2,96	0,75
Sieg	185	104	201	32,1
Swist	17,7	12,0	17,4	5,09
Wupper	274	291	310	162

	Juli 2003	September 2003	November 2003	Januar 2004
Agger	49,1	62,2	176	143
Bröl	10,1	9,55	10,0	19,2
Dhünn	3,43	1,57	10,4	10,4
Ertf	23,8	21,5	30,0	45,2
Neffelbach	2,66	1,20	2,56	5,21
Rotbach	0,28	0,40	1,16	3,23
Sieg	38,2	66,0	93,7	184
Swist	3,59	2,13	3,50	14,3
Wupper	160	121	537	343

Da die angeschlossene Bevölkerungszahl in einem Gebiet, durch die die Einträge geschehen, innerhalb des Jahres recht konstant ist, kann man mit den Frachten den verbrauchsabhängigen Eintrag im Jahresverlauf erkennen, ohne dass eine Variable (Wasserverbrauch) den Vergleich erschwert.

Auch anhand dieser Tagesfrachten lässt sich die Veränderung im Jahresverlauf gut ablesen. Die niedrigsten absoluten Gehalte an Antibiotika sind in den Monaten Mai, Juli und September zu sehen, die höchsten im Dezember 2002 (bzw. November 2003 in der Wupper).

In Abbildung 48 sind von zwei Flüssen die einzelnen Tagesfrachten der sechs Probenmonate im Jahr 2003 zu einer Gesamtmenge aufsummiert worden, und die prozentualen Anteile der einzelnen Monate daran dargestellt.

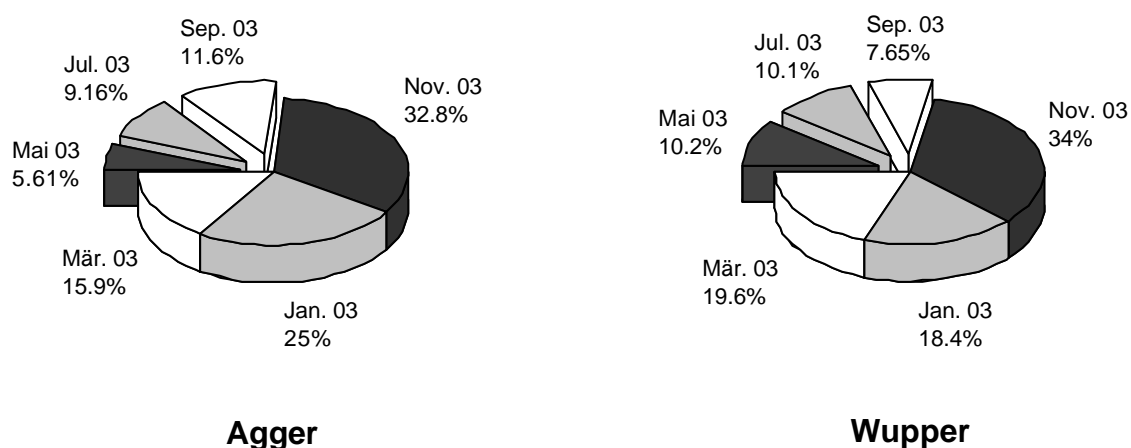


Abbildung 48: Summe der Tagesfrachten (Summe von neun Antibiotika); Darstellung der prozentualen Anteile der einzelnen Monate am Gesamtaufkommen der Probemonate im Jahr 2003 [%] in Agger und Wupper

Aus Abbildung 48 wird schnell klar, dass die drei Proben aus dem Winterhalbjahr (Januar, März und November) deutlich mehr als die Hälfte der Summe ausmachen, wie es bei einem steten gleichbleibenden Eintrag ansonsten der Fall wäre. Vielmehr machen sie knapp drei Viertel der Gesamtmenge aus.

Bei einer gleichbleibend hohen Fracht wäre der prozentuale Anteil eines einzelnen der sechs Probenahmemonate am Gesamtaufkommen im Jahr $16\frac{2}{3}\%$. Allerdings beträgt der Anteil der Wintermonate durch eine stark erhöhte Antibiotikaaanwendung deutlich mehr. So wurden in der Wupper von den summierten Tagesfrachten allein 34 % durch einen einzigen Probenahmemonat (November) bestimmt und weitere 20 % durch den Monat März. In der Agger machten die Wintermonate einen noch größeren Anteil am Gesamtaufkommen aus. Hier liegt das Einzelaufkommen des Novembers bei etwa 33 %, des Januars bei 25 % und der Märzprobe bei etwa 16 %. Des Weiteren erkennt man, dass auch im März zum Teil noch erhebliche Mengen an Antibiotika in die Gewässer eingetragen werden (auch wenn das an den Konzentrationen im Oberflächenwasser nicht direkt erkennbar war, sondern erst bei der Berechnung der theoretischen Abwasserkonzentrationen, oder wie hier, bei den Frachten). Auch im März können durchaus noch große Erkältungswellen auftreten. Demgegenüber machen die Monate Mai bis September nur einen geringen Anteil an den summierten Tagesfrachten aus. Bei gleichbleibender Verteilung hätten sie bei den sechs Probenahmeterminen einen Anteil von 50 % der Summenfracht. In Wirklichkeit beträgt der Anteil aber noch nicht einmal 30 %. Der Rest wird alleine durch die Proben des Winterhalbjahres bestimmt.

Vergleicht man die Tagesfrachten (Tab. 35) mit den Konzentrationen, erkennt man eine gewisse Disparität in Bezug auf zwei Punkte:

1. Bedingt durch die niedrigen Wasserstände in den Gewässern, aufgrund der ungewöhnlichen Trockenheit des Sommers 2003, waren in den Sommermonaten sehr hohe Konzentrationen gemessen worden. Die Frachten waren jedoch genau dann am niedrigsten. Andererseits waren in den Monaten mit Hochwasser zwar sehr niedrige Konzentrationen in den Flüssen zu finden, aber es gab dennoch sehr hohe Frachten, da es sich um die Monate Januar und März handelte.
2. In den Flussgebieten Swist und Neffelbach wurden zwar die höchsten Konzentrationen an Antibiotika nachgewiesen, aber im Vergleich zu anderen Flüssen transportierten sie nur sehr geringe Frachten. Dagegen zeigte beispielsweise die Sieg nur moderate Konzentrationen, aber sehr hohe Frachten.

Das heißt, dass zwar mitunter in kleinen Flüssen und Bächen sehr hohe Konzentrationen gemessen werden und sie zu den belastetsten gehören können, dass sie aber in Bezug auf das Gesamtvorkommen von Antibiotika in der Umwelt meist nur nachrangiger Ordnung sind.

Insgesamt verglichen, liegen die Frachten in den beobachteten Gewässern am Tag zwischen 280 mg (Rotbach im Juli) und dem zweitausendfachen davon mit 540 g (Wupper im November) (siehe Tab. 35). Ansonsten wird je nach Gewässergröße und Monat der gesamte Bereich dazwischen abgedeckt. So unterschiedlich die Frachten in Rotbach und Wupper auch sind, so sind die theoretischen Kläranlagenabwässer darin (siehe Tab. 33) gar nicht einmal so verschieden, sondern unterscheiden sich deutlich weniger voneinander. Aufgrund des geringeren Anteiles von Abwasser im Rotbach resultieren nur niedrigere Konzentrationen in diesem Gewässer. Weisen bei solchen Konzentrationen die Flüsse und Bäche zusätzlich noch kleine Abflussvolumina auf, so resultieren nur geringe Frachten. Die Abflussmengen lagen beim Rotbach an den Probenahmeterminen zwischen 0,19 und 0,93 m³/s und bei der Wupper zwischen 6,0 und 24,1 m³/s. Die Frachten werden, zumal fast nur der Eintrag von Humanantibiotika durch die Kläranlagen erkannt werden kann, zunächst durch die Anzahl der Einwohner im Einzugsgebiet bestimmt. So leben im Einzugsgebiet des Rotbaches vor der Probenahmestelle 18.600 Personen, wohingegen in das Wasser der Wupper die Arzneimittelrückstände von immerhin 778.000 Personen (also mehr als vierzig Mal so viel) eingeleitet und weitertransportiert werden. Dass dennoch gewisse Unterschiede zwischen den Gewässern zustande kommen, die nicht alleine auf der Einwohneranzahl begründet sind, und dazu führen, dass der Faktor der Bevölkerung (zwischen Rotbach und Wupper 40 x) nicht auch genau im gleichen Maße in den Frachten wiedergefunden werden kann, liegt an weiteren Einflussfaktoren. Erkennbar war eine weitere Variable⁷³ auch schon daran, dass sich die theoretischen Abwässer der Regionen unterschieden. Auch zwischen der Agger und der Erft, die mit 273.000 bzw. 231.000 Einwohnern einen vergleichbaren Gesamteintrag von Humanantibiotika erwarten lassen dürften, bestehen in den real beobachteten Frachten gewisse Unterschiede. Ähnliche Frachten (erkennbar sowohl an der Gesamtfracht, als auch an den Frachten der einzelnen Antibiotika) sind in den Flüssen Rotbach und Neffelbach enthalten, die eine Anliegerzahl von jeweils etwa 20.000 haben. Von den Einwohnerzahlen in den Gebieten müsste die Summen der Frachten aus Sieg und Agger (zusammen 719.000) ähnliche Werte ergeben wie die Frachten der Wupper. Größenordnungsmäßig stimmen die

⁷³

nicht die des durchschnittlichen Abwasservolumens von 150 L, sondern die in Kap. 4.2.3.4 f als Hauptursache erkannte

Summenfrachten, als auch die Einzelfrachten sogar überein (siehe Tab. 35). Betrachtet man die Frachten an Erythromycin (Tab. 36), so zeigen hierbei Erft und Agger ebenso wie bei der Summenfracht deutliche Unterschiede, die sich nicht mit der Bevölkerungszahl erklären lassen. Obwohl die Unterschiede in den Einwohnerzahlen zwischen Swist und Dhünn und zwischen Bröl und Dhünn vom Faktor her drei bzw. zwei betragen, so sind die Frachten in diesen Flussgebieten jedoch durchaus vergleichbar in der Summe und in der Einzelfracht.

Tabelle 36: *Tageseinzelfracht von Erythromycin [g] in neun Oberflächengewässern im Großraum Köln-Bonn in der Zeit von Dezember 2002 bis Januar 2004*

Gewässer	Dez. 2002	Januar 2003	März 2003	Mai 2003
Agger	60,8	21,7	11,7	4,07
Bröl	14,5	4,57	3,80	1,00
Dhünn	4,38	n.n.*	1,38	0,58
Erft	26,0	10,3	9,03	1,80
Neffelbach	1,69	0,80	0,93	0,14
Rotbach	1,08	1,00	1,68	0,10
Sieg	4,43	13,8	28,8	5,03
Swist	3,18	2,31	3,47	0,41
Wupper	72,9	60,3	75,5	24,5
	Juli 2003	September 2003	November 2003	Januar 2004
Agger	5,07	7,14	53,3	24,1
Bröl	2,04	2,07	3,13	3,32
Dhünn	0,30	n.n.*	5,92	2,31
Erft	2,96	1,08	5,72	6,87
Neffelbach	0,24	0,14	0,25	0,37
Rotbach	0,05	n.n.*	0,35	0,64
Sieg	3,71	9,49	27,1	24,0
Swist	0,17	0,07	0,58	1,52
Wupper	22,3	15,1	120	53,9

* n.n. = nicht nachweisbar

Die Höhe der Frachten kann zwischen Sommer und Winter ganz beträchtlich schwanken, wobei es deutliche Unterschiede in der Schwankungsbreite der einzelnen Gewässer gibt. So betragen die jahreszeitlich bedingten Unterschiede in Wupper, Erft und Sieg nur das vier- bis fünffache (auch Neffelbach sechsfach) bei der Tagesfracht der neun Antibiotika. In anderen Gewässern hingegen waren die Unterschiede noch deutlicher, wie bei Agger, Swist und Bröl

mit einer achtfach höheren Menge im Winter, bzw. in Dhünn und Rotbach mit dem 13-15fachen der Menge. Noch gravierender waren die Differenzen in der Einzelfracht von Erythromycin, wobei in manchen Monaten zum Teil Gehalte nahe der Bestimmungsgrenze oder darunter gemessen werden konnten und somit auch die Frachten entsprechend niedrig waren. Größeren Schwankungen in den Gehalten scheinen insgesamt die kleineren Gewässer zu unterliegen. In den größeren, die mit ihren Einzugsbereichen die Einleitungen von mehr als 200.000 Einwohnern beinhalten und die durch ihre Einzugsgebietsflächen Einleitungen aus vielen verschiedenen kleineren Zuflüssen bekommen, scheint es eher einen Ausgleich möglicherweise vorhandener Differenzen in den einleitenden Vorflutern zu geben. In den kleinen Gewässern hingegen kann bei einer Grippewelle der Unterschied im Verbrauchsverhalten und in den Einleitungen direkt an den Oberflächengewässern zu erkennen sein. Ist die Grippewelle vorüber, so ist in den Gewässern danach entsprechend weniger oder gar nichts mehr zu finden. Eine Rolle bei diesen Schwankungen spielt in geringem Ausmaße auch die Anwesenheit von Krankenhäusern an den Flussgebieten, durch die ein kontinuierlicher Eintrag von Antibiotika geschieht. Durch einen solchen Basiseintrag würde ein Gewässer nicht so gravierenden Änderungen unterliegen.

Von der absoluten Höhe der Frachten gesehen, haben die Flüsse mit mehr als 200.000 Anwohnern Gehalte an Erythromycin von 4-61 g/Tag (Agger) bzw. 1-26 g/Tag (Erft). Flüsse mit etwa 20-30.000 Anwohnern enthalten 0,1-1 g/Tag (Rotbach), 0,1-1,7 g/Tag (Neffelbach) und 0,3-5,9 g/Tag (Dhünn). Diese Frachten sind sehr vergleichbar mit den gefundenen Frachten von Clarithromycin in schweizerischen Kläranlagen, an die eine entsprechende Zahl an Einwohner angeschlossen ist (siehe Kap. 2.7.1.4). Nicht vergleichbar sind die hier berechneten Erythromycin-Frachten mit den ERY-Frachten aus den schweizerischen Kläranlagen, da die Anwendungsmenge von Erythromycin pro Person dort nur ein Zehntel beträgt, wohingegen Clarithromycin in gleicher Menge pro Person angewendet wird, wie Erythromycin in Deutschland.

Bedeutung der Tagesfrachten

Betrachtet man mit Blick auf Tab. 36 die gesamte Schwankungsbreite der Tagesfrachten, so lagen diese für ERY zwischen 100 mg und 120 g. Um sich diese Zahlen ein wenig genauer vorstellen zu können, sei darauf hingewiesen, dass die Einzeldosis davon in einer Tablette meist etwa 500 mg beträgt. Dementsprechend konnten unter Bedacht auf die Abbaubarkeit im Rotbach oder im Neffelbach im Juli 2003 (abstrahiert ausgedrückt) die Rückstände einer

einigen Tablette gefunden werden, oder aber die Rückstände aus wenigen dermalen Behandlungen; folglich also nur aus der Behandlung eines Bruchteiles der Bevölkerung in dem Gebiet von etwa 20.000 Personen. Die Mengen in der Wupper von 15 bis 120 g pro Tag betrachtet, wären es insgesamt 30 bis 240 Tabletten, die als Rückstände noch vorhanden sind, also bei einem durchschnittlichen Abbau von 50 % innerhalb der Kläranlagenprozesse und 40 % im Körper ursprünglich 100 bis 800 Tabletten. Die Tagesfracht von Sulfamethoxazol in der Wupper betrug im September 2003 66 g und im November 2003 230 g. Mit einer Dosis von 800 mg pro Tablette wären dies 83 bzw. 288 Tabletten, die an den entsprechenden Tagen in der Wupper transportiert wurden. Den Abbau in Kläranlage und Körper zugerechnet, ständen damit auf der Konsumseite 660 bzw. 2300 g pro Tag⁷⁴, was 825 bzw. 2875 Tabletten wären.

Jahresfrachten

Im BLAC-Bericht wurde die Feststellung gemacht, dass die Frachten der Arzneistoffe in Deutschlands Gewässern vergleichbar mit denen von Pflanzenschutzmitteln sind, da auch diese in den Flüssen in Konzentrationen im ng/L Bereich zu finden sind. Allerdings ist der Eintrag von Pflanzenschutzmitteln noch stärker saisonal abhängig. Für den Rhein wurden Jahresfrachten von Erythromycin (1.200 kg), Clindamycin (1.400 kg), Sulfamethoxazol (3.000 kg) und Trimethoprim (800 kg) errechnet. Die Einzugsgebietsfläche des Rheins erfasste dabei etwa 50 Mio. Einwohner (nicht nur aus Deutschland). Zum Vergleich dazu seien die Jahresfrachten aus dem Jahr 2003 für verschiedene Gewässer dargestellt (Tab. 37). Die Werte basieren dabei auf den Durchschnittskonzentrationen innerhalb der sechs Probemonate des Jahres 2003, verrechnet mit den durchschnittlichen Jahresabflussmengen⁷⁵.

74

Es kann sein, dass sich aus dem Hauptmetaboliten N4-Acetylsulfamethoxazol im Gewässer wieder die Ausgangssubstanz zurückbildet und somit die Zahl der hochgerechneten Konsumseite zu hoch angesetzt ist, da ein Abbau im Körper von 80 % eingerechnet wurde.

75

Die mittlere Konzentration, der einzelnen Antibiotika, die hier verwendet wird, beruht lediglich auf Messungen aus sechs Probenahmeterminen, ist daher nicht gleichbedeutend mit einer Durchschnittskonzentration, die auf kontinuierlichen Messungen beruhen würde, kann aber, da die Proben im zweimonatlichen Abstand gezogen wurden und außerdem verschiedenste hydrologische Zustände auftraten, als Anhaltspunkt für eine ungefähre mittlere Jahreskonzentration dienen und für die Berechnung vergleichender Frachten herangezogen werden.

Tabelle 37: *Jahresfrachten von CLI, ERY, SMX und TRI in vier großen Flüssen im Großraum Köln-Bonn [kg]*

	Agger	Erft	Sieg	Wupper
Clindamycin	9,11	2,87	12,2	28,1
Erythromycin	6,92	1,87	11,6	22,0
Sulfamethoxazol	43,9	7,48	38,1	52,1
Trimethoprim	3,74	0,45	3,07	16,1

Die hier dargestellten Werte liegen deutlich unter denen des Rheins, berücksichtigt man aber die Einwohnerzahl (siehe Kap. 4.2.3.4 c Tab. 32), so sind die Werte vergleichbar (Tab. 38).

Tabelle 38: *Jahresfrachten von CLI, ERY, SMX und TRI in vier großen Flüssen im Großraum Köln-Bonn [kg] unter Berücksichtigung der Anwohnerzahl, Werte des Rheins aus BLAC-Bericht, Werte aus Tab. 37 umgerechnet auf eine Gesamtbevölkerung von 80 Mio. Einwohnern, Jahresaufwandmengen aus Tab. 6 in 2002*

	Agger	Erft	Sieg	Wupper	Rhein	Jahresmenge
Clindamycin	2666	992	2187	2884	2240	7000
Erythromycin	2026	646	2077	2264	1920	14000
Sulfamethoxazol	12836	2589	6849	5355	4800	40000
Trimethoprim	1095	155	553	1653	1280	9000

Somit liegen die hier berechneten Frachten im gleichen Bereich wie die Literaturwerte des BLAC [85]. Betrachtet man die echten Einzelwerte, so werden mit dem Wasser dieser größeren Flüsse jedes Jahr Antibiotikarückstände in der Größenordnung von mehreren Kilogramm transportiert. Diese Menge ist proportional zur Anzahl der Bevölkerung im Einzugsgebiet, wenn es auch im Vergleich mancher Flüsse miteinander durchaus Abweichungen geben kann. Die gleiche Proportionalität war auch schon in Kap. 4.2.3.4 c, Abb. 45 zu erkennen, in der die Konzentrationen in den Gewässern in Bezug zum Abwasseranteil gesetzt wurden. In dem Wert des Abwasseranteiles war dabei neben dem Wasserabfluss die Bevölkerung mit einem Proportionalitätsfaktor von 150 L enthalten, aus

den Konzentrationen in den Gewässern ergäbe sich die Fracht unter Berücksichtigung des Wasserabflusses.

Vergleicht man die Jahresaufwandmengen mit den hochgerechneten Frachten der Gewässer (Tab. 38), so fällt auf, dass die gefundenen Mengen, deutlich unter den verwendeten Mengen liegen und nur ein Drittel bis ein Zehntel (Ausnahme TRI in Erft und Sieg) betragen. Grund für diese Diskrepanz ist der Abbau der verwendeten Substanzen in Körper und Kläranlagen, sowie möglicherweise anschließend innerhalb der Gewässer, aber auch, dass evtl. weniger von Stoffen eingenommen wird, als verschrieben worden ist (siehe S. 241). Dies alles mitberücksichtigt, können die nach dem Verbrauch in die Umwelt eingetragenen Substanzen in den verschiedenen Flussgebieten in realistischer Größe wiedergefunden werden.

f) Frachten pro Einwohner

Um den Anteil der behandelten Bevölkerung in den einzelnen Regionen genau vergleichen zu können, kann einerseits die schon dargestellte Gegenüberstellung der verschiedenen berechneten theoretischen Abwässer dienen (siehe Kap. 4.2.3.4 d). Andererseits kann der direkte Vergleich aber besser durch die Tagesfracht pro Einwohner verdeutlicht werden. Dadurch wird die Unsicherheit des tatsächlichen Abwasseranteiles umgangen (siehe Anfang des Unterkapitels e). Es ist wahrscheinlich, dass die Zahl der Bevölkerung im zeitlichen Verlauf eines Jahres in einer Region keinen großen Schwankungen unterliegt und zwischen den Regionen die Zahlen relativ konstant bleiben, wodurch ein Vergleich der Frachten möglich ist. Lediglich im Sommer kann es sein, dass die Bevölkerungszahl bedingt durch die Urlaubszeit leicht abnimmt und der Betrag der Fracht pro Einwohner eigentlich etwas höher ist (ein solcher Einfluss würde sich aber auch auf den Abwasseranteil niederschlagen, der dann niedriger als berechnet wäre). In den betrachteten Proben hatte die Sommerurlaubszeit mit einer verringerten Bevölkerungszahl möglicherweise eine Auswirkung auf die Proben von September, die zur Zeit der Schulferien in Nordrhein-Westfalen gezogen wurden.

Aus den Summenkonzentrationen von neun Antibiotika in den Gewässern, den jeweiligen Wasserabflussdaten zu den verschiedenen Probenahmeterminen und den Einwohnerzahlen in den Einzugsgebieten vor den jeweiligen Probenahmestellen, die anhand der Broschüre „Entwicklung und Stand der Abwasserbeseitigung in Nordrhein-Westfalen“ [159] zum

Erhebungszeitpunkt 2000 entnommen werden, wurden die Tagesfrachten pro Einwohner zu jedem einzelnen Probenahmezeitpunkt ausgerechnet (siehe Abb. 49).

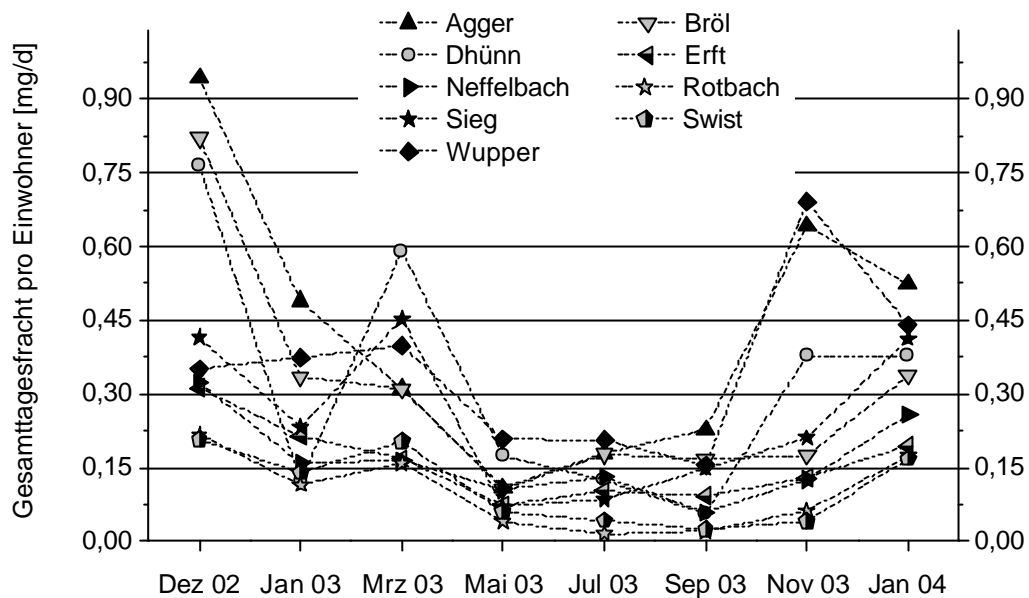


Abbildung 49: *Entwicklung der Tagesfrachten, als Summe von neun Antibiotika, pro Einwohner [mg/d] in neun verschiedenen Flüssen Nordrhein-Westfalens im Jahresverlauf⁷⁶*

Man erkennt, ebenso wie auch schon in den Abbildungen 46, 47 und 48 die jahreszeitliche Abhängigkeit der Antibiotikagehalte mit den bekannten Frachtspitzen. Die Entwicklung ist in der Bevölkerung in jedem einzelnen Flussgebiet zu beobachten. So ist die gleiche Tendenz zwar zu sehen, jedoch nicht in der gleichen Ausprägung. Wäre die Eintragungssituation gleich, so wäre primär mit den gleichen Frachten pro Einwohner zu rechnen. Besonders hoch zu gewissen Zeiten waren die personenbezogenen Tagesfrachten in den Gewässern Agger, Bröl, Dhünn und Wupper; eher niedrig dagegen in Erft, Neffelbach, Rotbach und Swist. Dies zeigt wieder einmal, dass die Konzentrationen in den Gewässern mit den absoluten Einträgen und dem Konsum in der Bevölkerung nicht immer proportional sind. Die Frachten pro Person lagen in der Summe im Winter zwischen 0,15 und 0,9 mg/Tag und im Sommer zwischen 0,02 und 0,2 mg/Tag. Die Tagesfracht pro Person von Sulfamethoxazol betrug im Winter

76

Die gestrichelten Linien sollen den Verlauf der Konzentrationen in der Jahresentwicklung verdeutlichen, wohlwissend, dass eine direkte Verbindung der Datenpunkte von acht Probenahmeterminen nicht guter wissenschaftlicher Praxis entspricht.

zwischen 0,04 und 0,4 mg/Tag und im Sommer zwischen 0,01 und 0,15 mg/Tag (siehe Abb. 50). Bei Clindamycin waren es zwischen 0 und 0,18 mg/Tag im Winter und im Sommer zwischen 0 und 0,05 mg/Tag. Die Fracht von Sulfamethoxazol war also erwartungsgemäß aufgrund der Anwendungshäufigkeit und der PEC deutlich höher als beispielsweise die von Clindamycin.

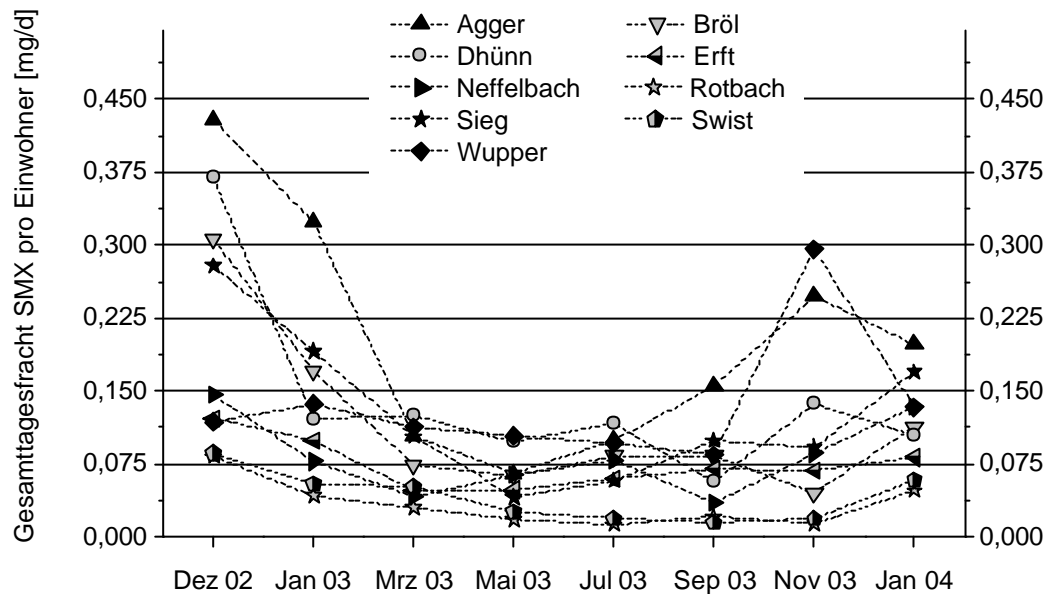


Abbildung 50: Entwicklung der Tagesfrachten von SMX pro Einwohner [mg/d] in neun verschiedenen Flüssen Nordrhein-Westfalens im Jahresverlauf

Behandlungsquoten in den Flussgebieten

Rechnet man bei Sulfamethoxazol und Clindamycin die jeweiligen Abbauraten (Körper, Kläranlagenprozess) mit ein, so kann man im Winter Mengen pro Person und Tag von 0,4-4 mg SMX und bis 1,2 mg CLI, und im Sommer von 0,1-1,5 mg SMX und bis 0,33 mg CLI erwarten. Mit den durchschnittlichen täglichen Dosen bei üblicher Anwendung zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen aller Art von 1600 mg SMX bzw. 1200 mg CLI lässt sich ausrechnen, dass für eine komplette DDD an SMX im Winter 4000 bzw. 400 Personen erforderlich sind, von denen jede/r pro Tag 0,4 bzw. 4 mg SMX einnimmt. Oder anders ausgedrückt, dass eine Person pro 4000 bzw. 400 zu dieser Zeit in der entsprechenden Gegend Sulfamethoxazolpräparate genommen hat. Im Sommer ist es eine Person pro 16.000 bzw. pro 1100, je nach Region. Bei Clindamycin liegt dieser Medikationsstatus im

Winter bei bis zu einer Person pro Tausend meist aber deutlich darunter, im Sommer wird sogar nur höchstens eine Person pro 3600 permanent mit Clindamycinpräparaten behandelt. Die Zahl der Behandlungen mit Clindamycin liegt folglich weit unter der Anzahl der Personen, die Cotrimoxazol[®] als antibiotisch wirkendes Medikament einnehmen.

Bezüglich Erythromycin war in Kap. 4.2.3.4 e, S. 252 „Bedeutung der Tagesfrachten“ beispielhaft für die Wupper die Anzahl der Tabletten berechnet worden, deren Rückstände innerhalb eines Tages in dem Fluss transportiert wurden. Dies waren im niedrigsten Fall 100, im höchsten Fall 800 Tabletten. Auch aus diesen Zahlen lassen sich die Behandlungsquoten ausrechnen: Bei einer Applikation von 3 x 1 Tablette pro Tag, ergäben sich aus den Tablettenzahlen 33 bzw. 267 DDD, die innerhalb eines Tages während der Behandlung von Patienten konsumiert werden. Bezogen auf die Gesamtbevölkerung von 778.000 anliegenden Einwohnern macht dies eine Medikation von 0,004 bzw. 0,035 % der Bevölkerung aus, also in dem einen Sommermonat von einer Person pro 23.000 und im Monat mit der höchsten Fracht von einer Person pro 2.900.

Aus der Zahl von 825 bzw. 2875 Tabletten mit dem Wirkstoff Sulfamethoxazol, die im Gebiet der Wupper pro Tag eingenommen wurden, ergäben sich bei einer täglichen Dosis von zwei Tabletten à 800 mg etwa 400 bzw. 1400 DDD. Wieder auf die gesamte Bevölkerung im Gebiet umgerechnet, beträgt die prozentuale Medikation mit Cotrimoxazol[®] Präparaten dadurch 0,05 bzw. 0,2 %, oder anders ausgedrückt eine Person pro 2000 im September und pro 500 im November. Diese Zahlen beziehen sich allerdings allein auf das Flussgebiet Wupper.

Betrachtet man wieder die personenbezogenen Tagesfrachten der einzelnen Monate (Abb. 50), so kann man einen Durchschnitt über die verschiedenen Flussgebiete berechnen. Als Mittelwert der Tagesfrachten in den Wintermonaten (November, Dezember und Januar) ergeben sich von SMX 0,144 mg/Tag und Person und von CLI 0,073 mg/Tag und Person; Abbauraten berücksichtigt, sind dies 1,44 bzw. 0,487 mg pro Tag und Person. Im Durchschnitt der Regionen im Winter erhält daher von etwa 1100 Personen eine einzige Sulfamethoxazol⁷⁷. Bei Clindamycin sind es im Schnitt von 2500 Personen eine einzige. In den Sommermonaten (Frachten gemittelt über alle Flussgebiete und über die Monate Mai, Juli

77

Die durchschnittliche Einnahme beträgt 1,44 mg. Um eine DDD von 1600 mg zu erreichen, müssen entweder 1111 Leute jeweils 1,44 mg pro Tag konsumieren, oder aber ein einziger muss im Zuge einer Behandlung 1600 mg einnehmen, und 1110 Leute nichts.

und September) betragen die Frachten in den Fließgewässern pro Person und Tag 0,066 mg an SMX und 0,025 an CLI, bzw. an ursprünglichen Frachten 0,656 mg SMX und 0,167 mg CLI. Als Durchschnitt der Behandlung im Sommer mit Sulfamethoxazol nimmt von 2400 Personen der Bevölkerung eine einzige SMX ein. Bei Clindamycin ist es im Durchschnitt sogar nur eine Person von 7100. Dennoch ist zu sehen, dass über das gesamte Jahr hin Antibiotika eingenommen werden, wenn auch mit unterschiedlicher Häufigkeit. Bei Erythromycin beträgt die durchschnittliche Behandlungsquote im Winter nur eine von 6000 Personen, im Sommer nur ein Sechstel dieser Quote.

Aus diesen Einzelbehandlungsquoten von SMX, CLI und ERY lässt sich berechnen, dass über die gesamten Probenahmegebiete gemittelt, eine Person von etwa 700 Personen im Winter Mittel mit einem dieser drei Wirkstoffe einnimmt. Berücksichtigt man noch die weiteren Antibiotika, die angewandt werden (vor allem die Penicilline mit sehr hohen Verschreibungsraten), so ist es im Winter sogar eine Person von nur wenigen Hundert, die mit Antibiotika behandelt wird. Dies ist jedoch gemittelt über mehrere Monate und über die verschiedenen Regionen. Betrachtet man die einzelnen Flussgebiete, so kann es zu gewissen Unterschieden kommen, wie gezeigt wurde.

Unterschiedlichkeit der personenbezogenen Tagesfrachten

Die Unterschiede, die zwischen den verschiedenen Gebieten bestehen, sind entweder anhand der Berechnungen zur Behandlungsquote zu erkennen, oder auch direkt an den Tagesfrachten pro Person, wie sie von Sulfamethoxazol in Abb. 50 dargestellt sind. Sie scheinen zu der Annahme zu führen, dass in der einen Region mehr Leute Antibiotika verschrieben bekommen und einnehmen, als in einer anderen. Eigentlich würde man erwarten, dass die Frachten pro Person in den verschiedenen Gebieten ziemlich identisch sein sollten, da man vermutete, dass auch in verschiedenen Gegenden eine gleiche Erkrankungshäufigkeit der Bevölkerung vorliegt. Woher aber kommt es nun, dass sich die Antibiotikamenge pro Person zum Teil sehr deutlich voneinander unterscheidet? Benötigen die Leute in den Einzugsgebieten von Agger, Bröl, Dhünn und Wupper mehr Antibiotika als in den Einzugsgebieten von Erft, Neffelbach, Rotbach und Swist oder sind sie öfter von Infektionen betroffen?

- Erklärungsansätze für Personenfrachtunterschiede -

Nicht erwartete Unterschiede tauchten schon im vorletzten Kapitel 4.2.3.4 d in den Konzentrationen der berechneten theoretischen Abwässer auf und waren auch hier in Bezug auf die Frachten pro Person und Tag zu sehen. Denkbar sind verschiedene Gründe, die dazu führen können, dass die Regionen in gewissem Maße voneinander differieren. Sie sollen hier beschrieben und erläutert werden. Diese Gründe haben allerdings nicht die gleiche Relevanz, so dass vor allem der letztangeführte als plausibelste Erklärung für das unterschiedliche Regionalverhalten dienen kann.

1. Unterschiede in den Erkrankungszuständen

Die erste Erklärung, die sich anbietet, ist ein möglicherweise unterschiedlicher Erkrankungszustand, so dass in manchen Regionen eine Erkältungswelle vielleicht nicht ausbricht und daher weniger Leute behandelt werden müssen. Allerdings müsste aufgrund der zum Teil recht großen Einzugsgebiete eine solche Krankheits- oder Gesundheitssituation nicht nur lokal auf ein paar Orte beschränkt sein, sondern weiträumige Gebiete erfassen (sonderbarerweise verlaufen die Gewässer mit niedrigeren Frachten pro Person, bzw. die Abwässer mit niedrigeren Konzentrationen alle linksrheinisch, wohingegen die mit höheren Konzentrationen im rechtsrheinischen Gebiet anzutreffen sind). Es ist daher schwierig, Gründe dafür zu finden, warum in einer Großregion die Menschen gesünder sind als in einer anderen. In den Wintermonaten könnte das bedingt noch mit dem Auftreten von Erkältungswellen zu erklären sein. Allerdings sieht man nicht nur im Winterhalbjahr in den besagten Regionen (Erft, Neffelbach, Rotbach und Swist) die niedrigen Frachtzahlen pro Person, sondern auch im Sommer, weshalb diese Begründung nicht genau zutreffen kann. Dass die Personen in diesen Regionen auch im Sommer weniger bakterielle Infektionen haben sollten (der Basisverbrauch an Antibiotika ebenfalls geringer sein soll) und in anderen 10mal mehr Infektionsbehandlungen durchgeführt würden, ist daher nicht stichhaltig und lässt diesen Begründungspunkt ins Leere laufen.

2. Unterschiede in den Verschreibungspraktiken

Es wäre möglich, dass die Ärzte in den verschiedenen Gebieten eine andere Verschreibungspraxis haben und in einer Region eher Sulfamethoxazol, Clindamycin und Erythromycin als Wirkstoffe verschreiben, in einer anderen hingegen möglicherweise eher Penicilline und Fluorochinolone, bzw. andere Makrolidwirkstoffe. Dennoch wäre es seltsam,

wenn in den vier Gebieten mit niedrigen Frachten pro Person überall die Ärzte diese drei Wirkstoffe gleichsam seltener verschrieben. Dass vielleicht örtlich begrenzt manche Ärzte statt Erythromycin eher ein anderes Makrolid wie Roxithromycin oder Clarithromycin verschreiben, mag zwar noch vorstellbar sein, aber da die Wirkstoffe speziell auf bestimmte Erregerspezies hin angewandt werden, wäre es beispielsweise fraglich, warum dann Sulfamethoxazol als quasi konkurrenzloses Sulfonamid (es ist das üblichste und es gibt nur wenige andere Sulfonamide im Humanbereich auf dem Markt) in gewissen Gebieten kaum mehr eingesetzt wird, wo es doch ein gut wirksames Mittel gegen grampositive und gramnegative Kokken ist. Daneben käme die Frage auf, warum in manchen Gebieten es gleichzeitig zu sehen ist, dass die Frachten von Erythromycin, Clindamycin und Sulfamethoxazol niedriger sind, als anderswo; als würde auf die Verschreibung all dieser drei Stoffe zusammen verzichtet werden, bzw. weniger von allen dreien verbraucht werden, als anderswo. Folglich könnte dieser Begründungspunkt zwar zum Teil für Einzelfälle und ein einzelnes Antibiotikum dienen, aber nicht zur Erklärung der Gesamtsituation in den verschiedenen Flussgebieten.

3. Unterschiede in der Krankenhausedichte in den Einzugsgebieten

Ein Erklärung für ein unterschiedliches Eintragsverhalten der Gesamtzahl von Antibiotika könnte auch daher rühren, dass in Einzugsgebieten mancher Flüsse mehr Krankenhäuser liegen, als von anderen. Da Krankenhäuser mit dem Antibiotikaverbrauch der Patienten bei der Berechnung der personenbezogenen Frachten bzw. der Abwasserkonzentrationen aus den Oberflächenwasserkonzentrationen nicht eingerechnet worden sind (es wurde immer nur die in den Gebieten wohnende Bevölkerung berücksichtigt), könnte es tatsächlich sein, dass sie gewisse Unterschiede in den Frachten bewirken können. Das wäre dann der Fall, wenn Personen aus dem Einzugsgebiet eines Flusses in einem Krankenhaus behandelt werden, dessen Abwässer den Vorflutern in einem anderen Einzugsgebiet zugeleitet werden. Außerdem könnten Unterschiede dadurch zustande kommen, dass die Zahl der behandelten Patienten (Bettzahl) in einem gewissen Gebiet höher ist als in einem anderen. Würde dies berücksichtigt, müsste der Gesamteintrag an Antibiotika pro Person, in den Gebieten mit prozentual mehr (in Krankenhäusern) behandelten Personen, geringer sein. Dies hätte sowohl im Winter als auch im Sommer Auswirkungen, da durch diese Behandlungen im gesamten Jahr der Basiseintrag höher wäre, als in einem Gebiet mit geringerer Patientenzahl, wo die Verschreibung zur Erkältungs- und Grippebehandlung den Hauptteil ausmacht.

Allerdings ist auch dieser Erklärungsansatz Nr. 3 nur bedingt haltbar; zum einen, da Daten zur Bettenzahl in den Regionen nicht zur Verfügung standen. Zum anderen müsste als Konsequenz der tatsächliche Eintrag von Antibiotika, die im Krankenhausbereich verwendet werden, in Gebieten niedriger Krankenhausdichte niedriger sein, als in anderen. Gemäß der Erhebung der Verbrauchsmengen von Antibiotika im Krankenhausbereich und der Abgabe über Apotheken [85]⁷⁸, macht der Absatz von Sulfamethoxazol, Clindamycin und Erythromycin über die Krankenhäuser nur einen geringen Teil der Gesamtmengen dieser Antibiotika aus. Circa 90 % der Gesamtmengen von SMX und ERY und 80 % von CLI werden über die Apotheken abgegeben und somit im häuslichen Bereich angewendet. Würde durch die geringere Anzahl an Krankenhäusern in einem Gebiet eine Reduzierung des Eintrags von Antibiotika erfolgen, so würde sich das auf das Vorkommen dieser drei Stoffe in der aquatischen Umwelt nur sehr geringfügig auswirken. Sichtbar wäre es lediglich bei solchen Antibiotika, die überwiegend in Krankenhäusern verwendet werden, wie z.B. Ampicillin (85 %), Penicillin G (94 %) oder Piperacillin (99,8 %).

4. Unterschiede des Probenahmeortes

Innerhalb der Gewässer kann nach dem Eintrag von Antibiotika aus den Kläranlagen eine weitere Reduzierung der Gehalte geschehen. Mit dieser Reduzierung ist nicht der Verdünnungseffekt durch weitere Zuflüsse gemeint, sondern ein tatsächlicher Abbau oder aber die Senke durch Adsorption an Sedimentpartikel. Je länger Antibiotikarückstände in den Gewässern verbleiben, desto stärker ist der Abbau. Liegt nach dem Eintragungspunkt eine weite Flussstrecke, bevor die Frachten gemessen werden, so kann es sein, dass sich diese auf dem Abschnitt schon deutlich reduziert haben. Somit wäre es denkbar, dass Unterschiede der Flussgebiete durch die Orte der Probenahmestellen zu begründen sind, wenn diese entweder in kürzerer oder weiterer Entfernung zum Eintragungsort liegen.

Die Probenahmeorte von Erft, Neffelbach, Rotbach und Swist (Gewässer mit niedrigen personenbezogenen Frachten) liegen zwischen 7 und 10 km stromabwärts der letzten kommunalen Kläranlageneinleitung. Die Gewässer mit höheren Frachten pro Person liegen zwischen 1 und 15 km abwärts der letzten Einleitungsstelle (Agger 3 km, Bröl 1 km, Dhünn 8 km, Wupper 15 km). Erstens werden trotz der größeren Entfernungen von Wupper und Dhünn darin hohe Werte gefunden und zweitens würden Entfernungen von wenigen Kilometern (auch bei 15 km) wohl nicht zu einer deutlichen Reduzierung der Gehalte führen, da die Verweildauer der Rückstände in den Gewässern bei einer so kurzen Strecke nur recht

⁷⁸

Werte aus der Erhebung des Instituts für medizinische Statistik und des UBA

gering ist. Zwar können Adsorptionen an die Schwebphase vergleichsweise schnell geschehen, (wobei die Wupper mit einem sehr hohen Anteil an Schwebstoffen dennoch höhere personenbezogene Frachten aufweist), zumindest ist aber ein biologischer Abbau oder ein photoinduzierter Abbau (abhängig von Keimzahlen, Gewässertiefe, etc.) in der kurzen Zeit nur von minderer Bedeutung.

5. Unterschiede in der Beschaffenheit der Oberflächengewässer

Denkbar als Begründung für unterschiedliche Frachten pro Person sind auch Gewässerparameter. Wie zuvor angesprochen kann ein Schwebstoffanteil zu einer Reduzierung der Einträge führen. Daher wäre es denkbar, dass Partikel in der Wasserphase, oder aber die Sedimente in manchen Gewässern so beschaffen sind, dass hieran eine gewisse Adsorption erfolgt. Allerdings zeigte ja die Wupper trotz hoher Feststoffanteile auch hohe Frachten pro Person. Möglich wäre dennoch, dass die linksrheinischen Gewässer in ihrer Schwebstoffbeschaffenheit anders aussehen, als die rechtsrheinischen und dass sie zu einer Verringerung der Stoffe führen können, wenngleich auch die Strecke, zwischen Eintrag und Messung nur gering ist. Dagegen spricht, dass Adsorptionsprozesse eigentlich auch schon vorab in den Kläranlagenprozessen stattfinden, wodurch weniger wassergängige Stoffe direkt an den Schlamm gebunden werden. Dies konnte anhand der Fluorochinolone während des Kläranlagenprozesses erkannt werden [128, 188], die anschließend nur im Schlamm, aber nicht mehr oder kaum mehr in der Wasserphase nachweisbar waren (siehe Kap. 2.7.1.4). Sedimentuntersuchungen im BLAC-Programm erbrachten Gehalte der adsorbierten Stoffe nur nahe der Bestimmungsgrenze was aber auf die Hydrophilie der Stoffe zurückgeführt wurde. Da auch SMX, CLI und ERY eher hydrophilen Charakters sind, ist auch bei ihnen nur mit geringer Adsorptionsneigung sowohl im Kläranlagenprozess als auch im Oberflächenwasser zu rechnen, und einem ebenfalls nur geringen Einfluss der Sedimente auf die Gehalte in den Gewässern. Dafür spricht auch, dass CLI und SMX nicht in Belebtschlamm nachweisbar waren und ERY nur im niedrigen $\mu\text{g}/\text{kg}$ Bereich.

Ein weiterer Gewässerparameter, der hier behandelt werden soll, ist das Verhältnis von Gewässeroberfläche zu Volumen, welches sich auf die Oxidation oder die Photodegradation der Antibiotika auswirken kann. In Bezug auf die untersuchten Gewässer ist die Abschätzung eines solchen Einflusses jedoch sehr schwierig, da jedes der Gewässer sowohl Bereiche hat, in denen es eher breit und flach (also mit großer Oberfläche) ist, als auch Bereiche hat, in denen es schmaler ist, dafür aber tiefer (mit geringer Oberfläche). Durch die Kürze der Fließstrecke vom Einleitungsort zur Probenahme dürfte der Abbau durch diesen Parameter

aber kaum erfolgen, auch nicht durch eventuelle Temperaturunterschiede der Flüsse, die zwar zwischen Sommer und Winter deutlich schwanken können, aber nicht entscheidend für eine Reduktion der Gehalte sind. Eher wirkten sich Temperatureinflüsse in den Kläranlagenprozessen zwischen Sommer und Winter mit unterschiedlich starkem bakteriellen Wachstum aus. Dieser Einfluss auf die Konzentrationen wird allerdings eher durch die starken jahreszeitlichen Unterschiede des Konsumverhaltens überdeckt, die sich in der gleichen Weise auswirken.

Die Beschaffenheit der Gewässer kann sich ferner auch auf die Nachweisbarkeit der Stoffe auswirken, nämlich durch eine unterschiedlich stark ausgeprägt Ionensuppression. In Kapitel 4.1.3.1 konnte aber schon gezeigt werden, dass eine Ionensuppression bei den Probenmessungen erfolgt, die sich unterschiedlich stark auf die Bestimmung der verschiedenen Substanzen auswirkt, die aber nicht besonders durch die Probenmatrizes der unterschiedlichen Gewässerprobenextrakte beeinflusst wird, sondern relativ konstant ist. Zwischen den einzelnen Substanzen gibt es zwar verschieden starke Suppressionen (Clindamycin gar keine Unterdrückung, Erythromycin ca. 40 %, Sulfamethoxazol 10-30 %, Trimethoprim ca. 50 %, eine Berücksichtigung erfolgt innerhalb der Wiederfindungsraten), aber diese sind sowohl in gering belasteten, als auch in stark matrixhaltigen Proben sehr ähnlich. Daher kann auch die Ionensuppression nicht zur Erklärung der Werte unterschiedlicher Frachten pro Person dienen. Zum einen unterscheiden sich die Frachten pro Einwohner in einem Monat zwischen verschiedenen Flüssen leicht um das 5-10fache, wohingegen die Auswirkung der Suppression zwischen verschiedenen Gewässern lediglich im Bereich weniger Prozente liegt, und zum anderen waren unter den Flüssen mit hohen Frachten pro Einwohner auch Wupper und Bröl, die mit größerem Abwasseranteil auch höhere Matrixanteile aufwiesen.

6. Unterschiede in den Abbauleistungen der Kläranlagen

Nachdem in den vorherigen Punkten der Einfluss der dort aufgeführten Gründe auf die unterschiedlichen Frachten pro Einwohner, bzw. auf die unterschiedlichen theoretischen Kläranlagenablaufkonzentrationen nur als untergeordnet oder als nicht haltbar erkannt wurde, so dass weder der Erkrankungszustand der Bevölkerung, die Verschreibungsgewohnheiten, die Krankenhäuser, die Probenahmeorte oder die Gewässer selbst als hauptursächlich erkannt werden konnten, gibt es einen weiteren Erklärungsansatz, der die Differenzen tatsächlich erklären kann.

In den Berechnungen der PEC war eigentlich von einer durchschnittlichen Abbauleistung der Kläranlagen ausgegangen. Dass Kläranlagen je nach Ausbaustufe in unterschiedlicher Weise Abwässer klären und zu einer Minderung der Schadstoffeinträge führen ist offensichtlich. Aufgrund der Vielzahl von Kläranlagen in den Gewässereinzugsgebieten war eigentlich damit gerechnet worden, dass sich auch die Abbauleistungen mitteln und somit die Unterschiede in den Höhen der Frachten (als absolute Menge) allein aufgrund der Bevölkerungszahlen in den Gebieten resultieren. Wenn man sich aber die Kläranlagen in den einzelnen Flussgebieten genauer ansieht, so kann man erkennen, dass sie im Mittel in einem Gebiet durchaus unterschiedliche Abbauleistungen haben, als in einem anderen Gebiet. Festgemacht werden kann dies an den Fähigkeiten zur Stickstoffminderung. Diese Minderung geschieht durch Mikroorganismen die zunächst im Belebtschlammverfahren (Belüftungsverfahren) größere Moleküle, wie auch Proteine, metabolisieren (veratmen) und in niedermolekulare Verbindungen (z.B. Nitrat nach der Nitrifikation) überführen [2]. In diesem Prozess, der durch Aerobier geschieht, werden auch Antibiotika teilweise abgebaut. In den meisten Anlagen (besonders in den größeren) erfolgt anschließend als anaerober Prozess der Schritt der Stickstoffminderung durch Denitrifikation, während der Nitrat zu Stickstoff reduziert wird. Auch während dieses Schrittes kann ein weiterer Abbau von Antibiotika stattfinden. Verfügen Kläranlagen nicht über dieses letzte Behandlungsverfahren oder aber über gar keine Stickstoffbehandlung⁷⁹, so wird auch die Abbauleistung bezüglich der Antibiotika nur vermindert sein. Vor allem viele der kleinen Abwasserbehandlungsanlagen mit weniger als 5.000 angeschlossenen Einwohnern wenden keine dieser besonderen Verfahren an [159]. Liegen in einem Flussgebiet vermehrt Kläranlagen mit einfachen Abwasserbehandlungen, so werden auch die Einträge der Antibiotika mit dem Ablaufwasser höher sein, als in Gebieten mit moderneren Anlagen.

Es wurden die Stickstoffminderungen⁸⁰ der einzelnen Anlagen in einem Gebiet (stromaufwärts der Probenahme) mit der jeweiligen Zahl der angeschlossenen Einwohner multipliziert. Aus diesen Werten wurde die Gesamtsumme gebildet und durch die Gesamtbevölkerungszahl dieses Gebietes dividiert, um den Mittelwert der Stickstoffelimination zu erhalten (Abb. 51).

⁷⁹

Gemäß Anhang 1 für kommunales und häusliches Abwasser der Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer (Abwasserverordnung - AbwV) vom 23. Oktober 2002 müssen Kläranlagen mit einer Ausbaugröße über 10.000 EW mit einer Stickstoffelimination ausgestattet sein.

⁸⁰

Als konservativer Ansatz wurden Stickstoffminderungsraten, die als „< 25 %“ angegeben waren, mit dem Wert 25 % in die Berechnungen einbezogen.

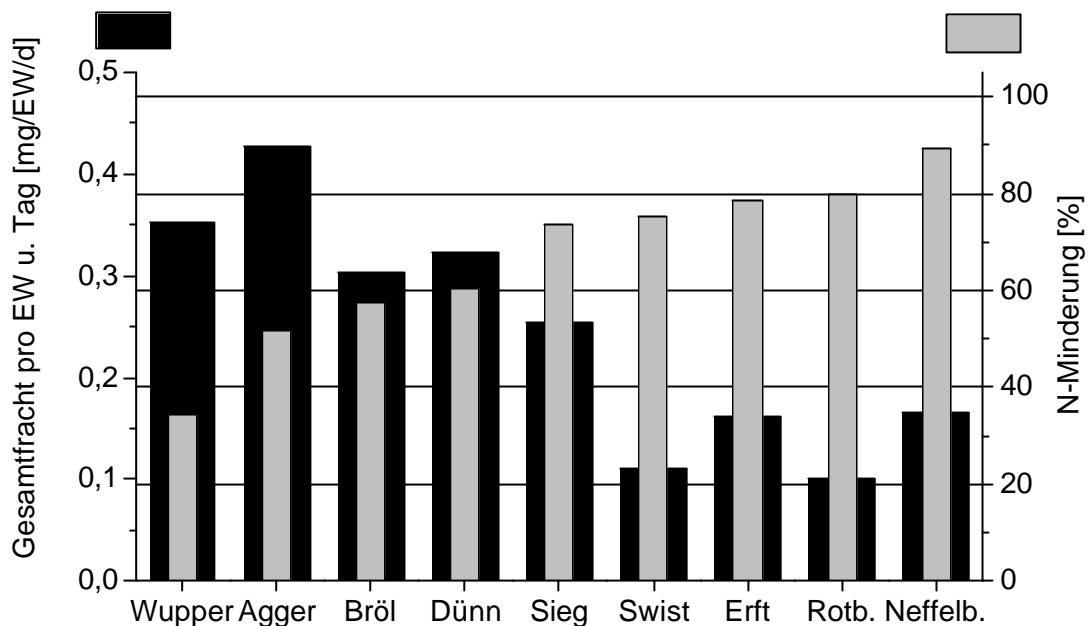


Abbildung 51: Darstellung der gemittelten Stickstoffminderungsraten in den Flussgebieten [%] und den mittleren Gesamtfrachten aus acht Probemonaten (Summe von neun Antibiotika) [mg/Einwohner/Tag], in neun verschiedenen Flüssen in Nordrhein-Westfalen

Sehr deutlich ist zu erkennen, dass die höchsten Frachten pro Einwohner in den Gewässergebieten vorhanden sind, in denen die Kläranlagen die schlechtesten Stickstoffminderungsraten aufweisen. Besonders niedrig sind diese bei der Wupper mit nur knapp über 30 %, aber auch bei Agger, Bröl und Dhünn nur 50-60 %. In dem Bericht des MUNLV-NRW zu Entwicklung und Stand der Abwasserbeseitigung in NRW [159] kam man daher bezüglich der Stickstoffelimination zu der Folgerung: beim Flussgebiet Sieg⁸¹ „besteht noch ein gewisser Ausbaubedarf, während beim Flussgebiet der Wupper erhebliche Defizite vorliegen“. Dahingegen weisen die linksrheinischen Flüsse mit den niedrigen Frachten pro Einwohner die besten Abbauraten für Stickstoff auf.

81

Zum Flussgebiet Sieg zählen auch Agger und Bröl, zum Flussgebiet Wupper zählt auch die Dhünn.

Daher ist es wahrscheinlich, dass, je fortschrittlicher und effektiver die grundsätzlichen Kläranlagenleistungen sind (besonders die biologische Abwasserbehandlung), und je besser die Reduzierung eines Standardparameters wie Stickstoff geschieht, desto besser auch die Gehalte an verschiedenen Antibiotika innerhalb dieser Prozesse vermindert werden können. Somit kann es sehr gut sein, dass die Unterschiede in den Frachten pro Person, bzw. in den theoretisch berechneten Kläranlagenabwässern vor allem durch die Unterschiede in den Kläranlagentypen herrühren. Die eben genannte Schlussfolgerung aus dem erwähnten Bericht [159] lässt sich nun also auch auf die Elimination von Antibiotika beziehen, nämlich, dass bei einigen Zuflüssen im Flussgebiet Sieg noch ein gewisser Ausbaubedarf besteht, während beim Flussgebiet der Wupper erhebliche Defizite vorliegen. Diese Defizite würden jedoch mit dem notwendigen Ausbau, der aufgrund der rechtlichen Anforderungen bezüglich der Stickstoffelimination noch geschehen muss, sowieso einhergehend behoben werden und bedürften daher keiner zusätzlichen Verfahren, die speziell auf Antibiotika abgestimmt sind, um die gleichen Werte (Frachten pro Person, bzw. Abwasserkonzentrationen) zu erhalten, wie sie in den anderen Gewässern vorliegen.

Betrachtet man nun statt der Korrelation mit der Stickstoffelimination, die Phosphoreliminationsraten in den Kläranlagen, so wird eine Korrelation nicht ganz so deutlich, wie sie zuvor möglich war. Auch hier sind wieder die einzelnen Eliminationsraten jeder Kläranlage mit den angeschlossenen Einwohnerzahlen multipliziert worden. Für jedes Einzugsgebiet wurde die Summe der entsprechenden Einzelwerte gebildet und durch die Gesamteinwohnerzahl dividiert, wodurch die mittlere Phosphorelimination in den Einzugsbereichen vor den Probenahmestellen erhalten wurde (siehe Abb. 52).

Eine leichte Tendenz, dass die Oberflächengewässer mit niedrigen Frachten pro Person hohe Phosphateliminationen zeigen, und dass die Eliminationsraten in den Flüssen mit höheren Frachten pro Person eher etwas darunter liegen, ist auch hier zu sehen, jedoch nicht so deutlich, wie bei der Darstellung mit der Stickstoffminderungsrate. Grund dafür ist, dass die Phosphatelimination nicht auf einem biologischen Abbau wie bei der Stickstoffelimination beruht, oder auf einem, bei dem aus einem komplexen Molekül niedermolekulare Verbindungen entstehen, sondern, dass es auf einer chemischen Fällung basiert. Das heißt, dass Phosphat einfach gebunden wird und als Feststoff abgetrennt werden kann. Einen Einfluss auf den Abbau von Antibiotika könnte dies nur insofern haben, falls manche Stoffe auch an diese Ausflockungen und Fällungen binden würden.

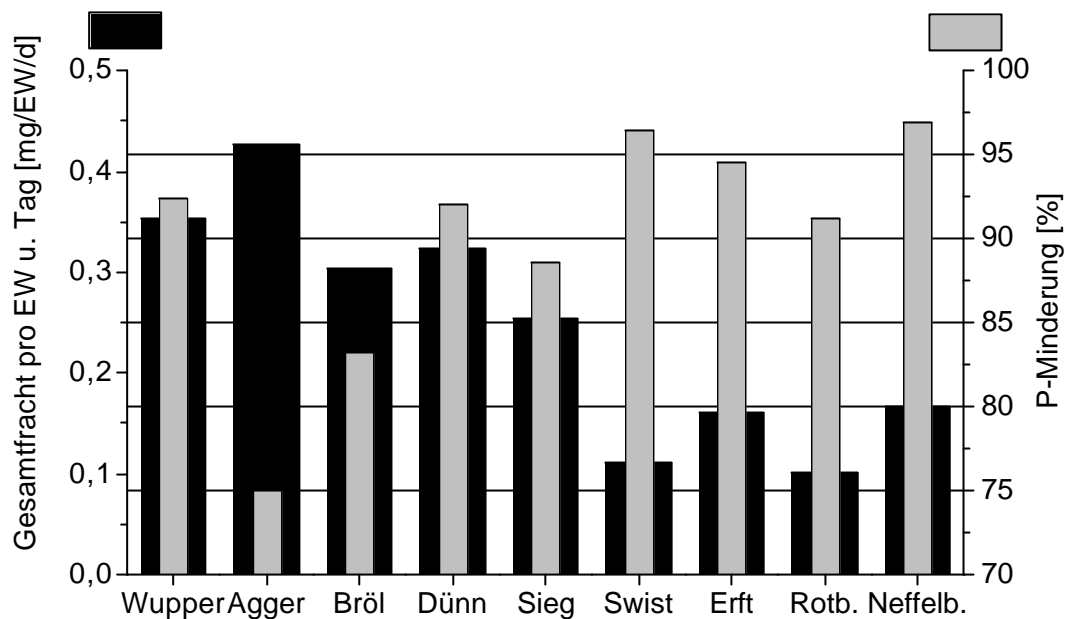


Abbildung 52: Darstellung der gemittelten Phosphoreliminationsraten in den Flussgebieten [%] und den mittleren Gesamtfrachten aus acht Probemonaten (Summe von neun Antibiotika) [mg/Einwohner/Tag], in neun verschiedenen Flüssen in Nordrhein-Westfalen

Viel wahrscheinlicher ist aber, dass tatsächlich eine Verbindung besteht zwischen der Abbaufähigkeit für Stickstoff und dem gleichzeitigen Abbau von Arzneimittelrückständen. Daher lässt sich mit diesem Ansatz am plausibelsten erklären, warum es zu Unterschieden der Frachten pro Person in den verschiedenen Flussgebieten kommen kann und warum die berechneten theoretischen Abwässer verschieden sind. Ferner ist es wahrscheinlich, dass die Kläranlagenzuläufe sich in den Flussgebieten nicht sonderlich unterscheiden. Zwar kann es durchaus Unterschiede zwischen einzelnen Zuläufen von Kläranlagen auch innerhalb eines Flussgebietes geben, aber im Mittel dürften in den verschiedenen Gebieten ähnliche Verschreibungsgewohnheiten vorherrschen, somit ähnliche Mengen an Antibiotika pro Person verwendet werden und damit auch ähnliche Konzentrationen in den Kläranlagenzuläufen zu finden sein, so dass das durchschnittliche Zulaufwasser von Kläranlagen an der Agger, der Bröl oder der Wupper sich nicht besonders von dem an Erft, Swist und Neffelbach unterscheidet. Erst mit den angewandten Kläranlagenverfahren resultieren daraus unterschiedlich konzentrierte Abwässer, die eingeleitet werden.

4.2.4 Bedeutung der Konzentrationen und Frachten für die Umwelt

Die in Kapitel 2.8 vorausgesagten Konzentrationen von Antibiotika in Kläranlagenabwässern und Gülle, sowie die Umweltkonzentrationen in Boden und Oberflächenwasser, mit denen zu rechnen wäre, konnten durch die durchgeführten Untersuchungen bestätigt und wiedergefunden werden. Die Konzentrationen reichten dabei in den aquatischen Medien von mehreren hundert ng/L bis zu wenigen µg/L für Kläranlagenabwässer, und von einstelligen bis zu dreistelligen ng/L-Konzentrationen für Oberflächenwässer. In den festen Matrices Gülle und Boden (nach Gülleausbringung) waren Antibiotikarückstände bis in den zweistelligen mg/L-Bereich (bis 19 mg/L, meist um 1 mg/L in Gülle), bzw. zweistelligen µg/kg-Bereich (bis 17 µg/kg TS Boden) enthalten. Auch wenn in Flüssen mitunter sehr hohe Gehalte zu finden waren (die Frachten reichten von weniger als 1 g pro Tag in kleinen Flüssen bis zu 500 g/Tag in größeren), so sind für die Bewertung der Umweltrelevanz darin allein die Konzentrationen bedeutsam, die auf Organismen und Prozesse einwirken.

4.2.4.1 Allergien

Zu den Effekten, die Antibiotika bewirken können, zählt unter anderem ihre mögliche Allergieauslösung. So haben z.B. Penicilline und auch Tetracycline (z.T. auch Fluorchinolone) Allergiepotential und auch Kreuzallergien sind möglich [29, 189]. Dieser Effekt tritt jedoch nur in Erscheinung, wenn der Körper tatsächlich mit dem Allergen oder einem ähnlichen Stoff in Kontakt kommt [190] und eine Immunantwort ausgelöst wird. Dies wirkt sich z.B. dann aus, wenn sensibilisierte Personen direkt ein Medikament mit diesen Wirkstoffen einnehmen [2].

Allein durch das Vorkommen in der Umwelt, wie im Oberflächenwasser oder im Boden ist nicht mit einer negativen Wirkung diesbezüglich zu rechnen, da diese nicht direkt aufgenommen werden. Denkbar wäre eine Auswirkung jedoch, falls Rückstände im Trinkwasser zu finden sein sollten, die hoch genug in der Konzentration wären, um, nach eingegangener Antigen-Antikörper-Bindung, Folgereaktionen auszulösen. Bisher wurden im Trinkwasser jedoch keine solchen Konzentrationen gefunden. Generell ist bisher erst eine Untersuchung bekannt, in der Antibiotika-Rückstände im Trinkwasser detektiert wurden [191]. Dabei lag die Konzentration von Sulfamethoxazol jedoch nur knapp über der Bestimmungsgrenze (wohl im unteren ng/L-Bereich). Gesundheitsgefährdungen waren laut

dem Leiter des LGL⁸² durch diese Gehalte allerdings nicht zu befürchten. Dennoch würden solche Substanzen nicht ins Trinkwasser gehören, und es sollten Strategien entwickelt werden, wie ein Eintrag zu verhindern sei. In der Regel tragen jedoch Wasserversorger in ausreichendem Maße dafür Sorge, dass eine nachteilige Beeinflussung ihres Rohwassers (z.B. Grundwasser) durch Abwasser nicht erfolgt [133], so dass Probleme mit dem Trinkwasser eigentlich nicht auftreten [192].

Betreffend möglicher Gehalte im Trinkwasser sei zusätzlich noch darauf hingewiesen, dass die Konzentrationen, die dort aufgetreten sind, neben der Tatsache, dass sie zu gering sind, um eine allergene Wirkung zu entfalten, deutlich unter der pharmazeutischen Wirkschwelle liegen und lediglich ein Millionstel der für eine Therapie notwendigen Konzentration betragen⁸³.

4.2.4.2 Kläranlagenprozesse

Eine weitere Wirkung die Antibiotika haben könnten, wäre die Beeinflussung von Kläranlagenprozessen, da Reinigungsschritte wie Nitrifikation und Denitrifikation auf die mikrobiellen Abbauschritte durch Bakterien angewiesen sind. Treten im Zulaufwasser Konzentrationen von Antibiotika auf, die über der Mindesthemmkonzentration mancher Bakterien liegen, so sind dadurch zwei mögliche Gefahren zu berücksichtigen:

1. Manche Populationen könnten abgetötet werden, die zur biologischen Abwasserbehandlung benötigt werden. Dies könnte die Effizienz der kompletten Anlage verringern.
2. Es könnte innerhalb der Kläranlage zu Resistenzbildung und Weiterverbreitung von Resistenzen kommen.

Sofern primär statt eines Absterbens oder einer Verringerung der mikrobiellen Besiedlung der Kläranlagen die Selektion und Vermehrung resistenter Keime geschieht, kann jedoch der Klärungsprozess weitergehen und der Abbau der verschiedenen Abwasserinhalts- und Schadstoffe, sowie die Stickstoffeliminierung fortgeführt werden.

Allerdings erfordern diese Thematiken nach Kümmerer [188] noch gewisse Forschungsanstrengungen, da zu klären sei, „in welchem Umfang es in Krankenhausabwasser

⁸² LGL

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

⁸³

Im Oberflächenwasser betragen die Konzentrationen bis zu 300 ng/L. Bei einer therapeutischen Dosis werden Gewebekonzentrationen bis etwa 20 mg/L angestrebt (siehe Kap. 2.4.1), die im Tagesverlauf auf wenige mg/L absinken können, aber damit immer noch etwa 100.000fach höher als die üblichen Umweltkonzentrationen liegen. Daher können die gemessenen Konzentrationen im Oberflächenwasser niemals eine therapeutische Wirkung bedeuten.

und im kommunalen Abwasser tatsächlich zur Resistenzausbildung kommt und inwieweit diese Resistenz durch Übertragung der Resistenzgene auf in Kläranlagen und Oberflächenwässern vorkommende Bakterien erhalten bleibt (...).“ Was den Eintrag von resistenten Bakterien aus Abwässern in Oberflächengewässer angeht, so konnte beispielhaft von Bendt et al. [8] gezeigt werden, dass das Klärwerk Düsseldorf-Süd über eine Eliminationsleistung von 99,91 % bei fäkalcoliformen Keimen, von 99,92 % bei gesamtcoliformen Keimen und von 99,86 % bei den koloniebildenden Einheiten verfügt. Dies zeigt aber immer noch, dass Keime aus den Kläranlagen in die Vorfluter gelangen können, und somit auch Resistenzen verbreitet werden. Allerdings sei nicht klar, wo und wie lange die Keime dann in der Umwelt überleben.

Zurückkommend auf die Kläranlagenprozesse wurde laut Kümmerer [188] in einem Test zur Kläranlagensimulation Ciprofloxacin zu 60 % an Belebtschlamm adsorbiert (zum Teil sogar mehr, siehe Einleitung Kap. 2.7.1.4), wobei nicht auszuschließen sei, dass es im Faulturm bei der Belebtschlammkonditionierung zur Störung der biologischen Prozesse kommen kann. Hingegen zeigten Untersuchungen zur Adsorption von Tetracyclinen an Böden, dass schon fünf Minuten nach Applikation der Lösung von Tetracyclinen keine Wachstumshemmung von Bakterien durch diese mehr nachgewiesen werden konnte und somit die adsorbierten Tetracycline nicht mehr antibiotisch wirksam waren [193]. Insgesamt bestehen zum Einfluss von Antibiotika auf generelle Kläranlagenabbauleistungen noch Wissensdefizite, besonders, wie sich Rückstände auf einzelnen Stufen auswirken. Zwar ist durch verschiedene Tests schon teilweise bekannt, wie hoch die Abbaubarkeit von Antibiotika in den Kläranlagen, z.B. in den einzelnen Reinigungsprozessen, ist [126, 194], nicht aber, welche Auswirkungen die Rückstände speziell auf die Bakterien in den Stufen haben und inwiefern Abbauleistungen verringert werden. Die Konzentrationen, die in den Kläranlagenabläufen vorhanden sind (hier ausgehend von Oberflächenwasserkonzentrationen berechnet, ergaben sich theoretische Abwässer mit Konzentrationen im Bereich weniger $\mu\text{g/L}$), bzw. die in den Stufen vorher bzw. im Zulaufwasser vorkommen (SMX bis 9 $\mu\text{g/L}$ in kommunalem Kläranlagenzuläufen; in Krankenhausabwässern bis zu 26 $\mu\text{g/L}$ für Piperacillin, siehe Einleitung Kap. 2.7.1.3 und 2.7.1.4), liegen allerdings in einer Größenordnung, die die üblichen MHK (normalerweise wenige mg/L , MHK von Piperacillin gegenüber *Yersinia pseudotuberculosis* 130 $\mu\text{g/L}$ [63]) nicht übersteigt und somit, wenn überhaupt, dann nur einen sehr geringen Selektionsdruck auf die Bakterien ausüben sollte und damit auch die Reinigungsprozesse nicht merklich stören sollte.

4.2.4.3 Wirkung auf Organismen

Die Abschätzung einer toxikologischen Wirkung auf verschiedene Organismen ist nur sehr schwer zu bewerkstelligen, da hierzu Toxizitätsdaten zur Giftigkeit gegenüber Daphnien, Bodenmikroorganismen, Algen, Erdwürmern und Pflanzen vorliegen müssen. Diese Daten hängen von den jeweiligen Substanzen und den Matrices ab. Koschorreck et al. [111] führten eine solche Bewertung für Makrolide nach dem Eintrag durch Tiere (Ausscheidung) in der Umwelt durch. Dabei fanden sie, aufgrund der starken Adsorption an Boden und damit vermindert verfügbarer Mengen, dass im Zuge der Gefahrenabschätzung weder für den Boden weitere Maßnahmen erforderlich seien, noch für Oberflächen- oder Grundwasser, da ein Eintrag aus der Veterinär Anwendung darin kaum zu befürchten stand.

Mit dem direkten Eintrag von Makroliden über die Kläranlagen ins Oberflächenwasser hingegen ist die Gefährdungsabschätzung neu durchzuführen. Die höchste Toxizität wies das Makrolid Erythromycin im Wasser gegen Grünalgen auf mit einer EC_{50} von 0,16 mg/L (Daphnien und Fische 57 mg/L bzw. 851 mg/L). Unter Verwendung eines Sicherheitsfaktors von 100 (siehe Kapitel 2.6.5) beträgt somit die PNEC 1,6 µg/L. Damit liegen die hier gefundenen Konzentrationen von Erythromycin im Oberflächenwasser mit höchstens 0,3 µg/L noch deutlich darunter und werden somit bzgl. Grünalgen, Daphnien und Fischen keine Umweltgefahren darstellen. In Kläranlagenabwasser kann zwar die Konzentration von 1,6 µg/L überschritten sein, was aber nicht relevant ist, da dies ja nicht als Umweltkompartiment gemäß der EMEA-Leitlinie CPMP/SWP/4447/00 draft [91] anzusehen ist und der Eintrag in die Oberflächengewässer mit einer gewissen Verdünnung verbunden ist.

Betreffend der Ökotoxizität von Antibiotika ist jedoch die Auswirkung auf Bakterien wesentlich bedeutsamer, da sie ja auch die Zielorganismen sind. Abschließend ist eine Umweltbewertung daher nur zusammen mit der Wirkung auf Mikroorganismen in der Umwelt (Oberflächenwasser) zu machen. Hierzu müsste man die minimalen Hemmkonzentrationen gegenüber verschiedenen umweltrelevanten Bakterienarten mit den gefundenen Konzentrationen vergleichen. Beispielhaft sei dies gegenüber Stämmen von *Yersinia pseudotuberculosis* und *Y. pestis* getan. Die niedrigste MHK von *Y. pseudotuberculosis* gegenüber ERY betrug dabei 16 mg/L (bei 2 von 40 Stämmen), von *Y. pestis* 32 mg/L (ein untersuchter Stamm) [63]. Mehr als 50 % der untersuchten Stämme (MHK_{50}) konnten mit Konzentrationen $>$ oder $=$ 64 mg/L bekämpft werden. Geht man konservativ von den niedrigsten MHK aus, und berücksichtigt einen Sicherheitsfaktor von 100, so müssten Konzentrationen von 160 µg/L bzw. 320 µg/L im Gewässer beobachtet

werden, um überhaupt diese PNEC⁸⁴ zu erreichen. Somit stellt Erythromycin mit höchstens 0,3 µg/L (Blac-Bericht 0,5 µg/L) gegenüber diesen Stämmen in der Umwelt keine Gefahr dar.

Anders kann es beispielsweise bei Ciprofloxacin aussehen. Im BLAC-Bericht wurde eine solche Abschätzung vorgenommen. Gegenüber Fischen wurde eine geringe Toxizität, gegen Daphnien und Algen eine mäßige Toxizität gefunden. Die Toxizität gegen *Pseudomonas putida* wurde als EC₁₀ von 1,8 µg/L angegeben, woraus bei einer 100fachen Sicherheit eine PNEC von 18 ng/L resultiert. Die maximal gefundene Konzentration im Oberflächenwasser betrug laut BLAC-Bericht 28 ng/L (in den eigenen Untersuchungen höchstens 17 ng/L). Somit beträgt das Verhältnis MEC/PNEC⁸⁵ 1,6 (nach den eigenen Untersuchungen 0,9), wodurch als Fazit erklärt wurde: „Ciprofloxacin muss aufgrund der hohen Bakterientoxizität und der schlechten Abbaubarkeit als ein Arzneimittelwirkstoff mit Umweltgefährdungspotential eingeschätzt werden.“ Dies allerdings auch unter dem Hinweis, dass die PEC das zehnfache des gefundenen Wertes beträgt und von höheren Konzentrationen, als den bisher gefundenen, im Oberflächenwasser auszugehen ist. Aus den eigenen Ergebnissen ist ein solches Gefährdungspotential nicht abzuleiten. Auch Golet et al. [152] kamen zu der Schlussfolgerung, dass es unwahrscheinlich ist, dass Fluorochinolonkonzentrationen in der aquatischen Umwelt des Oberflächenwassers oder auch bezogen auf Abbauprozesse in Kläranlagen zu negativen Effekten führen. Dabei wurde die Wirkung in Oberflächenwasser auf Algen überprüft (EC₅₀ = 3 mg/L => PNEC 3 µg/L mit 1000fachem Sicherheitsfaktor) bzw. in Abwasser auf *Pseudomonas putida* PNEC = 8 µg/L bzw. im Vergleich mit den MHK₉₀ gegen Bakterien mit Werten von > 10 µg/L oder den niedrigsten Konzentrationen von 5 µg/L Ciprofloxacin (25 µg/L Norfloxacin, NFL), die einen sichtbaren Effekt in einem Gentoxizitätstest (umuC-Test) haben (LOEC⁸⁶). Bestätigt wurde die Aussage, dass die gefundenen Konzentrationen im Abwasser von 0,18 µg/L als Summe von CFL und NFL (40 ng/L im Oberflächenwasser) wohl keine negativen Auswirkungen haben, durch NOEC⁸⁷ von 3 µg/L (CFL in Oberflächenwasser) bzw. 2 µg/L (NFL in Kläranlagenprozessen). Allerdings sollten zur weiteren Absicherung Daten über chronische Ökotoxizität und die Gesamtoxizität der Summe verschiedener Antibiotika ergänzt werden, sowie bzgl. der

⁸⁴ als Effekt (der „predicted no effect concentration“) ist hier die Wachstumshemmung gemeint, nicht der Effekt einer Resistenzbildung; siehe dazu nächsten Unterpunkt dieses Kapitels

⁸⁵ MEC/PNEC maximum environmental concentration/ predicted no effect concentration

⁸⁶ LOEC lowest observable effect concentration

⁸⁷ NOEC no observable effect concentration

Wirkung auf Bodenmikroorganismen (auch Sedimente und Böden nach Klärschlamm-ausbringung).

Auch wenn man die Wirkung von CFL auf *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* betrachtet, so liegen laut Stock et al. [63] die niedrigsten MHK bei ersteren Stämmen $<$ oder $=$ 10 $\mu\text{g/L}$, bei letzterem bei 30 $\mu\text{g/L}$. Das heißt, dass geringere Konzentrationen keine Wachstumshemmung haben und ein Sicherheitsfaktor zur Interspezies-Variabilität von 100 sehr vorsichtig ist. Dennoch werden die damit erhaltenen PNEC von etwa 100 ng/L bzw. 300 ng/L bei weitem nicht im Oberflächenwasser gefunden. Daher und an Betracht der anderen Ökotoxizitätsdaten sollten die gefundenen Konzentrationen weder auf Bakterien, noch auf Fische, Daphnien oder Algen eine Gefahr mit negativen Umweltauswirkungen darstellen.

4.2.4.4 Resistenzausbildungen

Wie in Kapitel 2.3.2 dargestellt, ist bei verbreiteter Anwendung von Antibiotika in zunehmendem Maße damit zu rechnen, dass es zur Ausbildung von Resistenzen kommen kann. Es konnte gezeigt werden, dass für das Auftreten von resistenten Erregern in Krankenhäusern hauptsächlich die Verwendung von Antibiotika im Humanbereich verantwortlich ist. Eine Reduzierung der Verwendung im Veterinärbereich hätte gemäß Smith et al. [6] nur geringe Effekte auf die Resistenzlage von Bakterien in Krankenhäusern, oder allgemein bei humanrelevanten Bakterien. Die Auslösung der Resistenzen geschieht üblicherweise dort, wo die höchsten Konzentrationen auftreten, also im Körper selbst. Dort werden Gewebekonzentrationen von einigen mg/L erreicht, die einen bakteriziden oder bakteriostatischen Effekt haben, und einen gewissen Selektionsdruck ausüben können. Gemäß Teuber [7] folgen Antibiotikumanwendung in der Humanmedizin und Resistenzentwicklung „epidemiologisch und mikrobiologisch erklärbaren Gesetzmäßigkeiten, die auch den Beitrag von Veterinärmedizin und Landwirtschaft zur Resistenzausbreitung betreffen.“ Ferner wird vermutet, dass Antibiotika, die in die Umwelt eingetragen werden, Resistenzen, multiple Resistenzen und Kreuzresistenzen in Organismen auslösen [83, 194]. Auch auf den besonderen Effekt von subletalen Dosen wurde hingewiesen. Die Untersuchung über das Vorkommen von antibiotikaresistenten Keimen in Kläranlagen [8] zeigte, dass resistente Keime in Kläranlagen weit verbreitet sind, und dass in allen untersuchten Indirekteinleitungen (Kliniken und Krankenhäuser, Industrie und häusliche Abwässer) antibiotikaresistente Keime nachweisbar waren. Somit sind vor allem die Kompartimente prädestiniert für das Auftreten von Resistenzen, in denen höhere Konzentrationen von Antibiotika vorkommen und in denen

viele Bakterien leben. Solche Voraussetzungen finden sich bei der Anwendung beim Menschen im Darm, auf Schleimhäuten, oder auch auf der Haut, so dass eine klare Beziehung zwischen dem Gebrauch von Antibiotika beim Menschen und dem Auftreten von Resistenzen erkannt werden konnte [9]. Nach der Untersuchung des Auftretens von resistenten Bakterien nach der Anwendung von Antibiotika in der Antiaknetherapie wurde gefolgert, dass ein erhöhter Konsum von Antibiotika einen erhöhten Selektionsdruck auf pathogene Erreger ausübt und somit Resistenzen ausgelöst werden können. Dies nicht nur durch die therapeutisch richtige Dosierung, sondern auch besonders durch zu geringe Dosierungen oder zu lange Zeiten der Anwendung.

Die Frage ist nun, inwieweit die in dieser Untersuchung gefundenen Konzentrationen dazu beitragen können, die Resistenzsituation zu beeinflussen.

Auswirkung der Einzelkonzentrationen

In Abwässern (siehe Kap. 4.2.3.4 d, 4.2.4.2) liegen die Konzentrationen ($\mu\text{g/L}$ -Bereich) (zumeist) schon deutlich unter den Mindesthemmkonzentrationen, so dass auch sensible Bakterien nicht gestört werden und mit einem Wachstumsvorteil von resistenten Erregern nicht zu rechnen ist, bzw. eine Auslösung und Ausbreitung von Resistenzen nicht erfolgt (siehe Kap. 2.3.2). Aufgrund der noch niedrigeren Gehalte in Boden und Oberflächenwasser ist auch hierin eine Auslösung und Verbreitung von Resistenzen nicht zu erwarten.

Die in Kapitel 2.3.2 erwähnten Mechanismen (nicht Resistenzen!), z.B. regulatorische Prozesse, die vorübergehend zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Antibiotika führen, werden hingegen durch niedrigere Konzentrationen als die MHK induziert. Mögen solche Mechanismen (nicht Resistenzen!) möglicherweise auch noch im Abwasser angeregt werden, so ist bei den Konzentrationen in Boden ($\mu\text{g/kg}$) oder in Oberflächenwasser (ng/L) eher nicht damit zu rechnen.

Summenwirkung

Betrachtet man nicht nur die Wirkung der Einzelsubstanzen, sondern das kumulative Auftreten verschiedener Wirkstoffe mit einer möglicherweise damit verbundenen synergistischen oder antagonistischen Kombinationswirkung, sowie die Exposition über längere Zeit, so sind auch hier die Konzentrationen in Boden und Oberflächenwasser wohl zu niedrig, um tatsächlich die Resistenzentwicklung zu beeinflussen. Dies kommt einerseits daher, da selbst die Summenkonzentrationen verschiedener Substanzen einer Gruppe unter $1 \mu\text{g/L}$ liegen. Andererseits liegt es daran, dass die Wirkstoffe verschiedener Gruppen auf

ganz unterschiedliche Prozesse in den Zellen wirken. Bei den vorkommenden Konzentrationen können schon die Einzelwirkungen kaum entfaltet werden und führen daher nicht zu einer Hemmung. In den Bakterien ist also eine Resistenz nicht erforderlich und die regulatorischen Prozesse reichen auch bei verschiedenen gleichzeitig auftretenden Substanzen zum Schutz aus.

Bezüglich der Auswirkungen des kumulativen und längerfristigen Auftretens von Antibiotikarückständen auf Mikroorganismen und Prozesse im Kläranlagenbereich besteht aufgrund der höheren Konzentrationen hingegen noch Aufklärungsbedarf.

Insgesamt lässt sich folgern, dass die gefundenen Antibiotikakonzentrationen in den Umweltkompartimenten Boden und Oberflächenwasser sicherlich nicht ausreichen, um die Resistenzentwicklung von Krankheitserregern, die in der Humanmedizin eine Rolle spielen, zu beeinflussen.

4.2.5 Konsequenzen und Maßnahmen

Die Untersuchungen zum Vorkommen von Antibiotika in der Umwelt zeigten, dass Rückstände dieser pharmazeutisch genutzten Wirkstoffe in Oberflächengewässern sehr weit verbreitet sind, wobei Substanzen aus der Humananwendung ungleich häufiger und in höheren Konzentrationen zu finden waren, als Substanzen aus der Veterinäranwendung. Dies traf gleichermaßen für beprobte Gewässer aus ländlichen und aus urbanen Gebieten zu. Für Veterinärantibiotika konnte mit Befunden in Gülle und in damit gedüngten Böden, die Landwirtschaft als wahrscheinlicher Eintrittspfad für das seltene Auftreten in Wasserproben erkannt werden. Als Haupteintragspfad von Humanantibiotika konnte das System der kommunalen Abwasserbehandlung ermittelt werden. Die Konzentrationen in den Bächen und Flüssen von bis zu 300 ng/L (meist deutlich unter 100 ng/L) waren abhängig von den Wasserabflussmengen, bzw. dem Anteil an behandeltem kommunalen Abwasser und damit von dem jeweiligen Verdünnungseffekt. Die Frachten waren abhängig von der Verschreibungsmenge und lagen im Winter deutlich höher als im Sommer. Je mehr Einwohner in den Einzugsgebieten der Flüsse wohnten, desto höher waren die Frachten. Außerdem wurden die Frachten pro Person von den jeweiligen Abbauleistungen der Kläranlagen beeinflusst.

Die Bewertung dieser Befunde von Antibiotikarückständen in der Umwelt führte zu der Einschätzung, dass eine Gefährdung der Umwelt und eine negative Beeinflussung humanmedizinisch relevanter Mikroorganismen durch die gefundenen Konzentrationen nicht zu befürchten ist. Eine mögliche Bildung oder Verbreitung von Resistenzen durch das Vorkommen von Rückständen in der Umwelt (Oberflächenwasser, Boden) kann durch diese und bisherige Ergebnisse nicht begründet oder bestätigt werden und ist somit eher untergeordneten Ranges, wohingegen die Rolle, die Kläranlagen in Bezug auf Entstehung und Verbreitung oder Verminderung und Abbau von resistenten Mikroorganismen spielen, noch weiter zu beobachten und zu klären ist.

Auch wenn kein direkter Grund zur Besorgnis besteht, so herrscht weitgehend die Meinung, dass dem Ziel der Eintragsvermeidung bzw. -verminderung nahe zu kommen ist [85]. Mit einem verminderten Eintrag und Vorkommen in Oberflächengewässern soll auch ein Auftreten in Grund- und Trinkwasser so weit wie möglich vermieden werden. Bisher bedeuten die Gehalte darin aus toxikologischer Sicht zwar keine direkte Gefährdung der Menschen, sie sind aber aus Hygienegesichtspunkten und im Hinblick auf das

Vorsorgeprinzip unerwünscht [125]. Auch nach Kümmerer [188] sollte aus umwelt-hygienischer und ökotoxikologischer Sicht eine Kontamination von Grund- und Trinkwasser vermieden werden. Huber et al. [195] sehen das Vorsorgeprinzip als vordringlichste Aufgabe der Reinhaltung von Trinkwasser von Rückständen pharmazeutischer Mittel, um das Risiko von unbekanntem Langzeiteffekten zu minimieren.

Möchte man Rückstände in der aquatischen Umwelt, selbst wenn diese keine negativen Auswirkungen haben, vermeiden, so bestehen zwei Möglichkeiten zur Minderung der Einträge: Entweder man setzt direkt am Ort des Einsatzes an, welcher gleichzeitig auch der Ort ist, an dem ursächlich die Gefahr der Bildung, Auslösung und Verbreitung von Resistenzen zu lokalisieren ist, also dem Einsatz in der Human- und auch Veterinärmedizin, oder man arbeitet an Strategien zur Verminderung der Einträge in die Umwelt, also am Abbau der Substanzen innerhalb der Kläranlagenabbauprozesse.

Einsparpotentiale

Nach Bendt et al. [8] sollten die Ursachen der Resistenzen am „Ort des Geschehens behoben werden“ und nicht in Klärwerken. Maßnahmen dazu sind vielfältig und wurden von Kümmerer [188] beschrieben. So wird bei den Antibiotika auf der Anwendungsseite von einem Reduktionspotential von 50 % im Bereich der Humanmedizin und im Bereich der Veterinärmedizin ausgegangen, das durch bessere mikrobiologische Diagnostik und eine darauf abgestimmte Verordnungspraxis erzielt werden kann, da so die geeigneten Antibiotika ausgewählt werden und gezielter therapiert wird. Dazu zählt auch, dass durch Aufklärung unnötige Verschreibungen vermieden werden, beispielsweise, dass bei viral bedingten Erkältungskrankheiten nicht zwangsläufig Antibiotika indiziert sind. Ebenfalls sollte darauf geachtet werden, dass passende Dosierungen bzw. Zubereitungsmengen verwendet werden, die eine subtherapeutische Behandlung vermeiden. Weitere Möglichkeiten sind die Reduktion der Stoffvielfalt über eine Liste der wirksamen Stoffe; des weiteren eine sinnvolle Vorratshaltung, die die Vermeidung eines Verfalls vor Gebrauch vorsieht und damit zu entsorgende Mengen reduziert. Bei der Entsorgung ist ein Eintrag in die Umwelt dadurch zu vermeiden, dass Restmengen nicht über das Abwasser entsorgt werden, sondern separat gesammelt und evtl. zum Hersteller zurückgehen. Sofern dies nicht möglich ist, sollten Reste als Abfall entsorgt werden. Insgesamt geht es nicht darum, Arzneimittelwirkstoffe zu verbieten, sondern eine Verringerung des Eintrages mit einem verantwortlichen Einsatz zu verbinden.

Abbaumöglichkeiten

Die andere mögliche Strategie, die mit der Verwendungsseite kombiniert werden kann, beruht auf dem technologischen Konzept im Hinblick auf Verbesserungen in der Abwasser- und Rohwasseraufbereitung, wodurch ebenfalls eine Eintragsvermeidung und -verminderung verfolgt werden kann. Maßnahmen dazu sind Thema verschiedener Projekte (Rempharmawater [196], Poseidon [197]). Als Ansatz kann die Anwendung oxidativer Verfahren mithilfe von Ozon oder Wasserstoffperoxid sein, oder die Kombination dieser mit UV-Licht und dabei resultierenden Hydroxylradikalen [195, 198]. Denkbar ist dabei die Anwendung in Teilabwasserströmen aus Einleitungen hochbelasteter Wässer, wie Teilbereichen von Krankenhäusern und Kliniken, aber auch die Behandlung während der Trinkwasseraufbereitung.

Gemeinsam ist allen Strategien, sei es im Ansatz der Reduzierung der Verbrauchsmengen oder der Verminderung des Eintrages, der Schutz des Allgemeinwohles, damit auch in Zukunft Antibiotika noch als wirksame Mittel im Kampf gegen bakterielle Infektionen einzusetzen sind und sie die Gesundheit des Menschen schützen und Leben retten können.

5 Anhang

5.1 Abkürzungsverzeichnis

ABH	Aminobenzoessäurehydrazid
AK	Antikörper
AMG	Arzneimittelgesetz
AMO	Amoxicillin
AMP	Ampicillin
AM-VO	Arzneimittelverordnung
AS	Anschlussstelle
ASE	Accelerated Solvent Extraction (beschleunigte Lösungsmittel- extraktion)
BAB	Bundesautobahn
BBodSchG	Bundesbodenschutzgesetz
BBodSchV	Bundesbodenschutzverordnung
BG	Bestimmungsgrenze
BLAC	Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit
BSA	Bovines SerumAlbumin
CFL	Ciprofloxacin
CLA	Clarithromycin
CLI	Clindamycin
CMO	Carboxymethoxylamin
CTC	Chlortetracyclin
d	day (Tag)
Da	Dalton (= g/mol)
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCY	Doxycyclin
DDD	Defined Daily Dosis (durchschnittliche Tagesdosis)
DHF	Dihydrofolsäure
DMA	N,N-Dimethylacetamid
DMF	Dimethylformamid
EC	Effective Concentration, effektive Konzentration mit der eine Wachstumshemmung oder eine Reproduktionshemmung um einen gewissen Faktor erfolgt
EFL	Enrofloxacin
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EMA	European Medicines Evaluation Agency
ERY	Erythromycin

ESI	ElektroSpray Ionisation
FDNB	Fluordinitrobenzol
FMVO	Futtermittelverordnung
Glut-SDM	Glutaramyl-Sulfadimidin
GW	Grundwasser
HG	Hauptgruppe (gemäß Rote Liste)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	HorseRadish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
hum.	Humananwendung
KA	Kläranlage
KGW	Körpergewicht
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin, Hämocyanin von <i>Megathura crenulata</i>
LC	Liquid Chromatography (Flüssigchromatographie)
LGL	Bayrisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LUA	Landesumweltamt
MCY	Minocyclin
MEC	Maximum Environmental Concentration, maximal gemessene Umweltkonzentration
MeOH	Methanol
MHK	minimale Hemmkonzentration
MRL	Maximum Residue Limit (maximale Rückstandskonzentration)
MS	Massenspektrometrie
MUNLV-NRW	Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen
n.n.	nicht nachweisbar
NFL	Norfloxacin
NG	Nachweisgrenze
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NHS-Glut-SDM	mit N-Hydroxysuccinimid aktiviertes Glutaramyl-Sulfadimidin
NHS-Succ-SDM	mit N-Hydroxysuccinimid aktiviertes Succinamyl-Sulfadimidin
NHS-Succ-SMX	mit N-Hydroxysuccinimid aktiviertes Succinamyl-Sulfamethoxazol
OD	Optische Dichte
OFL	Ofloxacin
OTC	Oxytetracyclin
p-ABS	para-Aminobenzoessäure
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatpuffer)
PCG	Penicillin G (Benzylpenicillin)
PCV	Penicillin V (Phenoxymethylpenicillin)
PEC	Predicted Environmental Concentration (vorhersagbare/abschätzbare Umweltkonzentration)
PEC _{AW}	Predicted Environmental Concentration für Abwasser
PEC _{KA-Ab}	Predicted Environmental Concentration für Kläranlagenablaufwasser
PEC _{KA-Zu}	Predicted Environmental Concentration für Kläranlagenzulaufwasser

PEC _{ow}	Predicted Environmental Concentration für Oberflächenwasser
PNEC	Predicted No Effect Concentration (abgeschätzte Konzentration, die keine Effekte mehr auslösen kann)
PNOEC	Predicted No-Observed Effect Concentration (Konzentration, bei der kein Effekt erkannt werden konnte)
POD	Peroxidase, siehe HRP
RdH [®]	Riedel-de Haën
RL	Richtlinie
ROX	Roxythromycin
S/N	Signal to Noise ratio (Signal/Rausch-Verhältnis)
SA	Serumalbumin
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SDM	Sulfadimidin
SDZ	Sulfadiazin
SMX	Sulfamethoxazol
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
SPI	Spiramycin
Stabw	Standardabweichung
STR	Streptomycin
STR-CMO	Streptomycin mit amidisch gebundenem Carboxymethoxylamin
Succ-SDM	Succinamyl-Sulfadimidin
Succ-SMX	Succinamyl-Sulfamethoxazol
TBABH	Tetrabutylammonium-borhydrid
TCY	Tetracyclin
THF	Tetrahydrofolsäure
TM	Trockenmasse
TMB	Tetramethylbenzidin
TRI	Trimethoprim
TS	Trockensubstanz
TYL	Tylosin
VAN	Vancomycin
vet.	Veterinär Anwendung
VO	Verordnung
VRE	Vancomycin Resistente Enterokokken
WDF	Wiederfindungsrate
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

5.2 Herstellerfirmen von Geräten, Vertreiber von Chemikalien

Firmenname	Rechtsform	Firmensitz
Gerätehersteller:		
Alltech	GmbH	Unterhaching
Amersham Biosciences Europe	GmbH	Freiburg
Asys HiTech	GmbH	Eugendorf, Österreich
B. Braun Melsungen	AG	Melsungen
Bandelin Elektronik	GmbH & Co. KG	Berlin
Biohit Oyi	Corporation	Helsinki, Finnland
Bischoff Chromatography	GmbH	Leonberg
BMG LabTechnologies	GmbH	Offenburg
Carl Knauber Holding	GmbH & Co. KG	Bonn
Carl Roth	GmbH & Co. KG	Karlsruhe
CS-Chromatographie Service	GmbH	Langerwehe
Dionex	GmbH	Idstein
Eppendorf	AG	Hamburg
Gelman Laboratory, Pall Corp.	Corporation	East Hills, NY, USA
H+P Labortechnik	GmbH	Oberschleißheim, München
Heidolph Instruments	GmbH & Co. KG	Schwabach
Hermle Labortechnik	GmbH	Wehingen
Hewlett-Packard, Agilent Technologies	GmbH	Waldbronn
IKA® Works	GmbH & Co. KG	Staufen i. Breisgau
J. T. Baker	Corporation	Phillipsburg, NJ, USA
Jahnke&Kunkel	GmbH & Co. KG	Staufen i. Breisgau
Macherey-Nagel	GmbH & Co. KG	Düren
Merck	KGaA	Darmstadt
Mettler-Toledo	GmbH	Gießen
Millipore	GmbH	Schwalbach
Molecular Devices	GmbH	Ismaning, München
MZ Analysentechnik	GmbH	Mainz
Nunc™ Brand Products	GmbH & Co. KG	Wiesbaden
Phenomenex®	Ltd.	Aschaffenburg
Schleicher&Schüll	GmbH	Dassel
Separtis	GmbH	Grenzach-Wyhlen
SLS Färber-Skutlarek	GbR	Bad Münstereifel
VEB MLW Prüfgerätewerk		Medingen, Sitz Freital
Weck	GmbH & Co. KG	Wehr

Firmenname	Rechtsform	Firmensitz
Chemikalienlieferanten:		
Sigma-Aldrich Chemie Aldrich [®] , zu Sigma-Aldrich Chemie Fluka, zu Sigma-Aldrich Chemie Sigma [®] , zu Sigma-Aldrich Chemie Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich Chemie	GmbH	München
Bayer Health Care	AG	Leverkusen
Dr. Ehrendorfer	GmbH	Augsburg
AppliChem	GmbH	Darmstadt
VWR International	KGaA	Darmstadt
Roche Deutschland Holding	GmbH	Grenzach-Wyhlen
Carl-Roth [®]	GmbH & Co. KG	Karlsruhe

6 Literatur

- [1] Althaus, F. R. (2004). "Antimikrobielle Wirkstoffe und Entzündungshemmer," Universität Zürich, Zürich, http://www.vetpharm.unizh.ch/script/pdf_data/abcs.pdf.
- [2] Falbe, J., Regnitz, M. (1992). "Römpp Chemie Lexikon." Thieme Verlag, Stuttgart.
- [3] Dewdney, J. M., Maes, L., Raynaud, J. P., Blanc, F., Scheid, J. P., Jackson, T., Lens, S., Verschueren, C. (1991). "Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential." *Food and Chemical Toxicology*, 29 (7), 477-483.
- [4] Cribb, A. E., Spielberg, S. P. (1992). "Sulfamethoxazole is metabolized to the hydroxylamine in humans." *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 51 (5), 522-526.
- [5] Bundestierärztekammer. (2001). "Fachanhörung: Verbraucher schützen - Antibiotika-Einsatz in der Tierhaltung minimieren.", www.vetline.de/btk/aktuelles/pm/pm01_010.html.
- [6] Smith, D. L., Harris, A. D., Johnson, J. A., Silbergeld, E. K., Morris, J. G. (2002). "Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, PNAS*, 99, 6434-6439.
- [7] Teuber, M. (2000). "Antibiotikaresistenzen - Ausbreitung und Konsequenzen." *Biologen heute*, 2, www.vdbiol.de/artikel/teuber.html.
- [8] Bendt, T., Pehl, B., Gehrt, A., Rolfs, C.-H. (2002). "Antibiotikaresistente Keime in einem Klärwerk - Herkunft und Verbleib." *KA - Wasserwirtschaft, Abwasser, Abfall*, 49 (1), 49-56.
- [9] Kresken, M., Hafner, D. (1999). "Drug resistance among clinical isolates of frequently encountered bacterial species in central Europe during 1975 and 1995." *Infection*, 27, 2-8.
- [10] Lenzen-Schulte, M. (2002). "Und sie bewegen sich doch." *Frankfurter Allgemeine Zeitung*, 250, 42.
- [11] Stürmer, K. (2003). "Medizin mit bitterem Nachgeschmack." *Frankfurter Allgemeine Zeitung*, 19.11.2002.
- [12] Unselm, J., Rehmann, S. "Potenzielle Schadorganismen und Stoffe in Futtermitteln sowie in tierischen Fäkalien." *Mitteilung 4*, DFG-Arbeitsgruppe: "Zur Beurteilung von potenziellen Schadorganismen und Stoffen in Futtermitteln sowie in tierischen Fäkalien" der Senatskommission zur Beurteilung von Stoffen in der Landwirtschaft.
- [13] KTBL (2002). "Rückstände von pharmakologisch wirksamen Substanzen in Wirtschaftsdüngern." *KTBL-Arbeitsgruppe: Rückstände von pharmakologisch wirksamen Substanzen in Wirtschaftsdüngern*, KTBL, Darmstadt.

-
- [14] Daughton, C. G., Ternes, T. A. (1999). "Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change." *Environmental Health Perspectives*, 107 (6), 907-938.
- [15] Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.-L. (1999). "Occurrence of antibiotics in the aquatic environment." *The Science of the Total Environment*, 225, 109-118.
- [16] Hirsch, R., Ternes, T. A., Haberer, K., Mehlich, A., Ballwanz, F., Kratz, K.-L. (1998). "Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography A*, 815 (2), 213-223.
- [17] Halling-Sørensen, B., Nielsen, S. N., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Lützhof, H. C. H., Jørgensen, S. E. (1997). "Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review." *Chemosphere*, 36 (2), 357-393.
- [18] Ternes, T. A. (1998). "Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers." *Water Research*, 32 (11), 3245-3260.
- [19] Heberer, T. (2002). "Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data." *Toxicology Letters*, 131, 5-17.
- [20] Frick, E. A., Henderson, A. K., Moll, D. M., Furlong, E. T., Meyer, M. T. "Presence of pharmaceuticals in wastewater effluent and drinking water, metropolitan Atlanta, Georgia, July-September 1999." *Georgia Water Resources Conference 2001*, The University of Georgia, Athens, Georgia.
- [21] Kümmerer, K. (2001). "Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review." *Chemosphere*, 45 (6-7), 957-969.
- [22] Lindsey, M. E., Meyer, M., Thurman, E. M. (2001). "Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry." *Analytical Chemistry*, 73, 4640-4646.
- [23] Toussaint, B. (Red.) (1998) "Arzneimittel in Gewässern - Risiko für Mensch, Tier und Umwelt!?" Fachtagung, Landesmuseum Wiesbaden, 04.06.1998, Hessische Landesanstalt für Umwelt (Hrsg.), *Umweltplanung, Arbeits- und Umweltschutz*, 254, ISBN 3-89026-279-1.
- [24] Brumfitt, W., Hamilton-Miller, J. M. (1988). "The changing face of chemotherapy." *Postgraduate Medical Journal*, 64 (753), 552-558.
- [25] Waksman, S. A. (1950). "Streptomycin and neomycin: an antibiotic approach to tuberculosis." *British Medical Journal*, 2 (4679), 595-600.
- [26] Sauermost, R., Freudig, D. "Online-Lexikon der Biologie." Spektrum Akademischer Verlag, <http://www.wissenschaft-online.de/abo/lexikon/bio/4027>.

- [27] Stroh, K. (2002). "Antibiotika und Antibiotika-Resistenzen in Lebensmitteln und Umwelt" Bayerisches Staatsministerium für Landesentwicklung und Umweltfragen, München, <http://www.umweltministerium.bayern.de/service/umwber/antibiot.htm>.
- [28] FEDESA "Antibiotic use of animals does not threaten human health." *Pressemitteilung*, Initiatives of the European Federation of Animal Health - FEDESA, Konferenz, Visby, Schweden, 13.06.2001.
- [29] Arbeitsgruppe "Antibiotika-Leitlinien" (1999). "Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln." *Bundestierärztekammer (BTK), Arbeitsgemeinschaft der Leitenden Veterinärbeamten (ArgeVET)*, 1-18.
- [30] BfT (1997). "Leistungsfördernde Futterzusatzstoffe - Fragen und Antworten -." *BfT Informationen*, 1-14.
- [31] Kümmerer, K. (2001). *Pharmaceuticals in the Environment*, Springer-Verlag, Berlin, ISSN 3-54-0410678.
- [32] Galli, P., Nikusch, I. (2003). "Pflanzenschutz im Erwerbsobstbau 2003." Landesanstalt für Pflanzenschutz, Stuttgart.
- [33] Ministerium für Ernährung und Ländlichen Raum des Landes Baden-Württemberg (2001). "Bilanz der Bekämpfung der Feuerbrandkrankheit in Baden-Württemberg." *Pressemitteilung des MLR Baden-Württemberg*, 1-3.
- [34] BBA (2001). "Feuerbrand gefährdet den Obstbau." *Presseinformation*, 1-2.
- [35] "Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (Zusatzstoff-Zulassungsverordnung - ZzulV." *Bundesgesetzblatt. I*, S. 230 vom 29.01.1998."
- [36] BPI, VFA, BAH, VAP (2002). *Rote Liste 2002*, Rote Liste Service GmbH, Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH, Frankfurt a. M., ISBN 3-87193-252-3.
- [37] Schwabe, U., Paffrath, D. (2003). *Arzneiverordnungsreport 2003*, Springer Verlag, Berlin, ISBN 3-540-40188-1.
- [38] Coates, P., Vyakrnam, S., Eady, E. A., Jones, C. E., Cove, J. H., Cunliffe, W. J. (2002). "Prevalence of antibiotic-resistant propionibacteria on the skin of acne patients: 10-year surveillance data and snapshot distribution study." *British Journal of Dermatology*, 146, 840-848.
- [39] Trollenier, H., Kroker, R. (1998). "Übersicht verfügbarer Chemotherapeutika in der Veterinärmedizin." *Deutsches Tierärzteblatt*, 10, 996-997.
- [40] Petrausch, R. (Hrsg.) (2001). *Lila Liste - Remedia ad us vet.*, Delta Verlag GmbH, Berlin, ISBN 3-88615-622-2.

- [41] Kluge, K., Ungemach, F. R. (2000). "Arzneiliche Versorgung Lebensmittel liefernder Tiere: Alle nach EU-Recht erlaubten Wirkstoffe und ihre Zulassung in Deutschland." *Deutsches Tierärzteblatt*, 48, Beilage.
- [42] Bollmann, S. (2002). "Untersuchungen zur Wirkung nichtantibiotischer Futterzusätze auf die Darmflora sowie den Verlauf einer experimentellen *Escherichia coli*- bzw. *Salmonella Derby*-Infektion bei Schweinen." *Dissertation*, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.
- [43] Richter, A., Löscher, W., Witte, W. (1996). "Leistungsförderer mit antimikrobieller Wirkung: Probleme aus pharmakologisch-toxikologischer und mikrobiologischer Sicht." *Praktischer Tierarzt*, 7, 603-622.
- [44] "Verordnung des Bundesministers für Land und Forstwirtschaft, mit der Bestimmungen zur Durchführung des Futtermittelgesetzes 1999 erlassen werden (Futtermittelverordnung 2000)." *Bundesgesetzblatt II*, Nr. 93/2000, in den Fassungen der Novellen *Bundesgesetzblatt II* Nr. 51/2001 und 373/2001 (konsolidierte Fassung).
- [45] EU-Kommission (2002). "Kommissionsvorschlag: Neue Sicherheitsvorschriften für Futtermittelzusatzstoffe und Verbot von Antibiotika als Wachstumsförderer." *Presseinformationen*.
- [46] aho "EU: Weiter Antibiotika im Trutenfutter." [www.schweizerbauer.ch](http://www.schweizerbauer.ch/news/aktuell/artikel/13534/artikel.html)
<http://www.schweizerbauer.ch/news/aktuell/artikel/13534/artikel.html>.
- [47] Thurman, E. M., Dietze, J. E., Scribner, E. A. (2002). "Occurrence of antibiotics in water from fish hatcheries." *USGS Fact Sheet*, 120 (2), 1-4.
- [48] BBA (2002). "Antibiotika im Apfelanbau." *Presseinformation*, Biologische Bundesanstalt, Braunschweig.
- [49] Strasser, A. C. (2003). "Entwicklung eines Biosensors zum Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden in Milch - Herstellung der immunchemischen Komponenten." *Dissertation*, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- [50] Medicin-WorldWide "Antibiotika." A Med-World AG
<http://www.m-ww.de/pharmakologie/arzneimittel/antiinfektiva/antibiotika/index.html>.
- [51] Nelson, D. L., Cox, M. M. (2000). *Lehninger: Principles of Biochemistry*. World Publishers, New York, ISBN 1-57259-153-6.
- [52] Kennedy, D. G., McCracken, R. J., Carey, M. P., Blanchflower, W. J., Hewitt, S. A. (1998). "Iso- and epi-iso-chlortetracycline are the principal metabolites of chlortetracycline in the hen's egg." *Journal of Chromatography A*, 812 (1-2), 327-337.
- [53] CliniPharm-CliniTox. "Wirkstoffdaten." Institut für Veterinärpharmakologie und -toxikologie, Universität Zürich, http://www.vetpharm.unizh.ch/perldocs/index_i.htm.

- [54] Kapusnik-Uner, J. E., Sande, M. A., Chambers, H. F. (1995). "Antimicrobial agents: Tetracyclines, Chloramphenicol, Erythromycin, and miscellaneous antibacterial agents." *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, 1123-1153.
- [55] Wainwright, M. (1991). "Streptomycin: discovery and resultant controversy." *History Philosophy of the Life Sciences*, 13 (1), 97-124.
- [56] Schatz, A., Bugie, E., Waksman, S. A. (1973). "Selman Abraham Waksman, Ph.D. 22 July 1888-16 August 1973. Streptomycin reported." *Annales of Intern Medicine*, 79 (5), 678.
- [57] Otten, H., Plempel, M., Siegenthaler, W. (1975). *Antibiotika-Fibel*, Thieme Verlag, Stuttgart.
- [58] juro (2001). "Wieder wirksam - Antibiotika-Resistenz aufgehoben." *Süddeutsche Zeitung*, 28.08.2001.
- [59] Reinhard, E. (1995). *Pharmazeutische Biologie 1*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, ISBN 3-8047-1785-3.
- [60] Wiedemann, B. "Antibiotika - chemische Wunderwaffen ohne Wirkung." *Öffentliche Ringvorlesung zum Jahr der Chemie*, Bonn, 17.07.2003.
- [61] Huppertz, K. (2003). *Grenzwerte*, GENARS, http://www.genars.de/Daten/GW_d.pdf.
- [62] Brauers, J., Bagel, S., Kresken, M. "In-Vitro-Aktivität von Telithromycin und anderen Antibiotika gegenüber Streptokokkus pneumoniae, Haemophilus influenza und Moraxella catarrhalis in Deutschland." *7. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin*, Berlin.
- [63] Stock, I., Wiedemann, B. (1999). "Natürliche Antibiotika-Empfindlichkeit von Yersinia-pseudotuberculosis-Stämmen." *Chemotherapie Journal*, 8 (6), 219-226.
- [64] Kresken, M., Hafner, D. (1999). "Prävalenz der Antibiotikaresistenz bei klinisch wichtigen Infektionserregern in Mitteleuropa." Bericht über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft "Resistenz" in der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V., http://antiinfectives-intelligence.de/peg/ag_resistenz/bericht1998.pdf.
- [65] Deutsches Institut für Normung (2000). "Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mycobacterien) gegen Chemotherapeutika. Grenzwerte von antibakteriellen Wirkstoffen für die Bewertung der minimalen Hemmkonzentration (MHK).“ *DIN 58940-4, Beiblatt 1*, Beuth-Verlag, Berlin.
- [66] Wiedemann, B. (2004). "persönliche Mitteilung." Universität Bonn, Institut für Mikrobiologie & Biotechnologie, Abteilung für Pharmazeutische Mikrobiologie.

- [67] Pettit, R. K., Fakoury, B. R., Knight, J. C., Weber, C. A., Pettit, G. R., Cage, G. D., Pon, S. (2004). "Antibacterial activity of the marine sponge constituent cribrastatin 6." *Journal of Medical Microbiology*, 53 (1), 61-65.
- [68] Wang, G., Wilson, T. J., Jiang, Q., Taylor, D. E. (2001). "Spontaneous mutations that confer antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45 (3), 727-33.
- [69] Wiedemann, B. "Die Entwicklung der Pharmakologie der Antibiotika: Von t/2 zu PK/PD." *Bad Honnef Symposium 2002 Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Antibiotika*, Bad Honnef, http://www.antiinfectives-intelligence.de/peg/veranstaltungen/bad_honnef_symposium_2002/wiedemann.htm.
- [70] Paar, W. D. "Erfahrungen mit PK/PD-Parametern in klinischen Studien." *Bad Honnef Symposium 2002 Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Antibiotika*, Bad Honnef, http://www.antiinfectives-intelligence.de/peg/veranstaltungen/bad_honnef_symposium_2002/paar.htm.
- [71] Lode, H., Lubasch, A., Borner, K., Raffenberg, M., Alleweit, M. "Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von modernen Fluorchinolonen in pulmonalen Kompartimenten." *Bad Honnef Symposium 2002 Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Antibiotika*, Bad Honnef, http://www.antiinfectives-intelligence.de/peg/veranstaltungen/bad_honnef_symposium_2002/lode.htm.
- [72] Pfeil, E., Kratz, B., Schlederer, A., Thriene, W., Wiedemann, B. (2000). "Pharmakodynamik von Ceftributen und Roxithomycin bei *H. influenzae* und *M. catarrhalis*." *Chemotherapie Journal*, 9. Jahrgang (6), 218-220.
- [73] Craig, W. A. (1995). "Interrelationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics in determining dosage regimens for broad-spectrum cephalosporins." *Diagnostic Microbiology and Infections Disease*, 22 (1-2), 89-96.
- [74] Mevissen, M. (2003). "Antibiotika ABC," Universität Bern, Bern. http://www.vetmed.unibe.ch/studvet/download/year23/NOZ/WS03_04/Mevissen%20Antibiotikagruppen_VL.pdf.
- [75] Czock, D., Keller, F., Thalhammer, F. (2003). "Medikamentendosierung bei kontinuierlicher Hämodialyse." *Intensivmed*, 40, 369-381.
- [76] Kresken, M. "Manuskript der Empfehlungen zur parenteralen Initialtherapie bei Erwachsenen." Geschäftsstelle der Paul-Ehrlich Gesellschaft für Chemotherapie e.V c/o Antiinfectives Intelligence GmbH http://www.antiinfectives-intelligence.de/peg/Konsensuspapier_25_11_03.pdf.

- [77] Kommissionsmitteilung "Verzeichnis der zugelassenen Futtermittel-Zusatzstoffe, veröffentlicht gemäß Artikel 9t Buchstabe b) der Richtlinie 70/524/EWG des Rates über Zusatzstoffe in der Tierernährung (2002/C 329/EG)."
- [78] "Futtermittelgesetz." in der Fassung vom 25.08.2000, *Bundesgesetzblatt I*, S. 1358, zuletzt geändert durch „Gesetz zur Änderung futtermittelrechtlicher Vorschriften sowie zur Änderung sonstiger Gesetze.“ vom 08.08.2002, *Bundesgesetzblatt I*, S. 3116.
- [79] BfT (2000). "Überschaubares Risiko - Hohe Umweltsicherheit bei Tierarzneimitteln." *Tiergesundheit im Blickpunkt*, 33.
- [80] Winckler, C., Grafe, A. (2000). „Stoffeintrag durch Tierarzneimittel und pharmakologisch wirksame Futterzusatzstoffe unter besonderer Berücksichtigung von Tetrazyklinen.“ *UBA-Texte*, 44/2000, Berlin.
- [81] LUA-Brandenburg. (2001). *Tierarzneimittel in der Umwelt - Erhebungen von Tierarzneimittelmengen im Land Brandenburg für den Zeitraum von Juli 1998 bis Juni 1999*, LUA Brandenburg, Potsdam, ISSN 0948-0838
http://www.mlur.brandenburg.de/oe_a/luabd29.pdf.
- [82] Thiele-Bruhn, S., Mogk, A., Freitag, D. (2003). "Einsatz von Tierarzneimitteln zur Anwendung bei landwirtschaftlichen Nutztieren in Mecklenburg-Vorpommern." *Berichte über Landwirtschaft*, 3, 374-391.
- [83] Thiele-Bruhn, S. (2003). "Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - a review." *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 166, 145-167.
- [84] Ungemach, F. R. (2000). "Figures on quantities of antibacterials used for different purposes in the EU countries and interpretation." *Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum*, 93, 89-98.
- [85] BLAC (2003). *Arzneimittel in der Umwelt - Auswertung der Untersuchungsergebnisse*, Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit (BLAC), Hamburg,
http://www.blac-info.de/extern/stock/downloads/publikationen_10d.pdf.
- [86] WHO "ATC/DDD Index." WHO Collaboration Centre for Drug Statistics Methodology, <http://www.whocc.no/atcddd/>.
- [87] "Richtlinie 65/65/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften über Arzneimittel.“ vom 26. Januar 1965, *Amtsblatt EG*, L 22, S. 369.
- [88] "Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz, AMG).“ in der Fassung der Bekanntmachung von 11. Dezember 1998, *BGL I*, S. 3586, geändert durch „Neuntes Gesetz zur Änderung des Arzneimittelgesetzes“ vom 27. 7. 1999, *Bundesgesetzblatt I*, S. 1666
- [89] "Verordnung über verschreibungspflichtige Arzneimittel.“ in der Fassung der Bekanntmachung der Neufassung vom 30.08.1990, *Bundesgesetzblatt I*, S. 1866.

-
- [90] "Siebtes Gesetz zur Änderung des Arzneimittelgesetzes.“ vom 25.02.1998, *Bundesgesetzblatt I*, Nr. 11, S. 374.
- [91] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP), Draft: "Note for Guidance on Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use." *CPMP/SWP/4447/00 draft*, London, 24. Juli 2003.
- [92] "Richtlinie 93/39/EWG des Rates zur Änderung der Richtlinien 65/65/EWG, 75/318/EWG und 75/319/EWG betreffend Arzneimittel.“ vom 14. Juni 1993, *Amtsblatt EG*, L 214, S. 22.
- [93] BLAC. (1998). *Auswirkungen der Anwendung von Clofibrinsäure und anderer Arzneimittel auf die Umwelt und Trinkwasserversorgung*. Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit (BLAC), Hamburg, http://www.blac-info.de/extern/stock/downloads/publikationen_6d.pdf.
- [94] "Richtlinie 81/851/EWG des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über Tierarzneimittel.“ vom 28. September 1981, *Amtsblatt EG*, L 317, S. 1.
- [95] "Richtlinie 81/852/EWG des Rates über die analytischen, toxikologisch-pharmakologischen und tierärztlichen oder klinischen Vorschriften und Nachweise über Versuche mit Tierarzneimitteln.“ vom 28. September 1981, *Amtsblatt EG*, L 317, S. 16.
- [96] "Allgemeine Verwaltungsvorschrift zur Anwendung der Tierarzneimittelprüfrichtlinien.“ vom 30.03.1995, *Bundesanzeiger*, S 4241.
- [97] "Richtlinie 92/18/EWG der Kommission zur Änderung des Anhangs der Richtlinie 81/852/EWG des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über die analytischen, toxikologisch-pharmakologischen und tierärztlichen oder klinischen Vorschriften und Nachweise über Versuche mit Tierarzneimitteln.“ vom 20. März 1992, *Amtsblatt EG*, L 097, S. 1-23.
- [98] "Richtlinie 2001/82/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Tierarzneimittel.“ vom 06.11.2001, *Amtsblatt EG*, L 311/1, S. 11-66.
- [99] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluations Unit, Committee for Proprietary Medicinal Products (CVMP): "Note for Guidance: environmental risk assessment of veterinary medicinal products other than GMO-containing and immunological products." *EMEA/CVMP/055/96-final*, London, 14.-16. Januar 1997.
- [100] "Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs.“ vom 26. Juni 1990, *Amtsblatt EG*, L 224/1.

- [101] "Richtlinie 70/524/EWG des Rates über Zusatzstoffe in der Tierernährung." vom 23. November 1970, *Amtsblatt EG*, L 270, S. 1, zuletzt geändert durch „97/6/EG.“ *Amtsblatt EG*, L 35, S. 11.
- [102] "RL 87/153/EWG: Leitlinien zur Beurteilung von Zusatzstoffen in der Tierernährung.“ vom 16.02.1987, *Amtsblatt EG*, L 064, S. 19.
- [103] "Verordnung über die Qualität von Trinkwasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung - TrinkwV 2001).“ vom 21. Mai 2001, *Amtsblatt EG* L, 330 S. 32.
- [104] "Gesetz zur Ordnung des Wasserhaushaltes (Wasserhaushaltsgesetz - WHG).“ in der Fassung der Bekanntmachung vom 19. August 2002, *Bundesgesetzblatt I*, S. 3245.
- [105] "Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlamentes und des Rates zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik (WRRL).“ vom 23.10.2000, *Amtsblatt EG*, L 372, S.1.
- [106] "Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer (Abwasserverordnung - AbwV).“ vom 23. Oktober 2002, *Bundesgesetzblatt I*, 74, S. 4048.
- [107] "Gesetz zum Schutz vor schädlichen Bodenveränderungen und zur Sanierung von Altlasten (Bundes-Bodenschutzgesetz - BBodSchG).“ vom 17. März 1998, *Bundesgesetzblatt I*, S. 502.
- [108] "Bundes- Bodenschutz -und Altlastenverordnung (BBodSchV).“ vom 12. Juli 1998 *Bundesgesetzblatt I*, 1999, S. 1554.
- [109] "Verordnung über die Grundsätze der guten fachlichen Praxis beim Düngen (Düngeverordnung - DüngeV).“ vom 26. Januar 1996, *Bundesgesetzblatt I*, S. 118.
- [110] "Klärschlammverordnung (AbfKlärV).“ vom 15. April 1992, *Bundesgesetzblatt I*, S. 912.
- [111] Koschorreck, J., Koch, C., Rönnefahrt, I. (2002). "Environmental risk assessment of veterinary medicinal products in the EU - a regulatory perspective." *Toxicology Letters*, 131, 117-124.
- [112] Daughton, C. G. (2001). "Origins and fate of PPCPs in the environment." U.S. EPA, Las Vegas, <http://www.epa.gov/esd/chemistry/images/ppcps3.jpg>.
- [113] Kramarz, S. "Antibiotika in der Chirurgie." *xxmed science* <http://www.xxmed.de/science/antibiotika.html>.
- [114] Kühne, M., Körner, U. "Tetracycline residues in meat and bone meal." *in: EuroResidue IV Conference*, Veldhoven, Holland, 704-706.
- [115] Kühne, M., Wegmann, S., Kobe, A., Fries, R. (2000). "Tetracycline residues in bones of slaughtered animals." *Food Control*, 11 (3), 175-180.

- [116] Kennedy, D. G., McCracken, R. J., Hewitt, S. A., McEvoy, J. D. G. (1998). "Metabolism of chlortetracycline: drug accumulation and excretion in the hen's egg." *Analyst*, 123 (12), 2443-2447.
- [117] Langhammer, J.-P. (1989). "Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe als Rückstände in Gülle und im landwirtschaftlichen Umfeld." *Inaugural-Dissertation*, Universität Bonn.
- [118] Grünenthal. (1999). "Fachinformation-Supracombin."
- [119] Ternes, T. (1998). "Abbau und Verhalten von Pharmaka in aquatischen Systemen." *Chemische Stressfaktoren in aquatischen Systemen*, Weigert, B., Steinberg, C., Brüggemann, R., Wasserforschung e.V. (Hrsg.), Berlin, 23-34, <http://www.wasserforschung-berlin.de/schrift/band6/6-ter.pdf>.
- [120] Halling-Sørensen, B., Lützhof, H., Andersen, H. R., Ingerslev, F. (2000). "Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46 Suppl A, 53-58.
- [121] Färber, H., Skutlarek, D., Exner, M. (2004). "Untersuchung von Kläranlagen-abwässern eines Universitätsklinikums, von kommunalem Abwasser sowie von Oberflächenwasser und Uferfiltraten auf Rückstände ausgewählter Antibiotika - Abschlussbericht zum Forschungsprojekt." Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit, Universität Bonn, Bonn.
- [122] ATV-DVWK. (2001). "Nachhaltige Wasserwirtschaft, Teil 1: Abwasser." Thaler, S. (Hrsg.), ATV-DVWK Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e.V., Hennef.
- [123] Tyczkowska, K. L., Voyksner, R. D., Aronson, A. L. (1992). "Solvent degradation of cloxacillin in vitro - tentative identification of degradation products using thermospray liquid chromatography-mass spectrometry." *Journal of Chromatography A*, 594 (1-2), 195-201.
- [124] Myllyniemi, A.-L., Rannikko, R., Lindfors, E., Niemi, A. (2000). "Microbiological and chemical detection of incurred penicillin G, oxytetracycline, enrofloxacin and ciprofloxacin residues in bovine and porcine tissues." *Food Additives and Contaminants*, 17 (12), 991-1000.
- [125] Heberer, T. (2002). "Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water." *Journal of Hydrology*, 266, 175-189.
- [126] Golet, E. M., Xifra, I., Siegrist, H., Alder, A. C., Giger, W. (2003). "Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil." *Environmental Science & Technology*, 37 (15), 3243-3249.
- [127] Golet, E. M., Alder, A. C., Hartmann, A., Ternes, T. A., Giger, W. (2001). "Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection." *Analytical Chemistry*, 73 (15), 3632-3638.

- [128] Alexy, R., Lange, F. T., Metzinger, M., Wenz, M., Sommer, A., Kümmerer, K. (2003). "Verbrauch und Umweltkonzentrationen von Antibiotika." *Kurzreferate, Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft - Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Stade*, 26.-28.05.2003, 143-147.
- [129] Hamscher, G., Sczesny, S., Höper, H., Nau, H. (2002). "Determination of persistent Tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry." *Analytical Chemistry*, 74 (7), 1509-1518.
- [130] Samuelsen, O. B., Torsvik, V., Ervik, A. (1992). "Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance towards oxytetracycline in a fish farm sediment after medication." *The Science of the Total Environment*, 114, 25-36.
- [131] Tolls, J. (2001). "Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils." *Environmental Science & Technology*, 35 (17), 3397-3406.
- [132] McArdell, C. S., Molnar, E., Suter, M. J.-F., Giger, W. (2003). "Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt Valley watershed, Switzerland." *Environmental Science & Technology*, 37, in press
- [133] Sacher, F., Gabriel, S., Metzinger, M., Stretz, A., Wenz, M., Lange, F. T., Brauch, H.-J., Blankenhorn, I. (2002). "Occurrence of drugs in groundwaters - results of a monitoring program in Baden-Württemberg." *Vom Wasser*, 99, 183-196.
- [134] 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." *Environmental Science & Technology*, 36 (6), 1202-1211.
- [135] Warman, P. R., Thomas, R. L. (1981). "Chlortetracycline in soil amended with poultry manure." *Canadian Journal of Soil Science*, 61, 161-163.
- [136] Berger, K., Petersen, B., Büning-Pfaue, H. (1986). "Persistence of drugs occurring in liquid manure in the food chain." *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 37 (4), 99-102.
- [137] Schlüsener, M. P., Bester, K., Spiteller, M. (2003). "Determination of antibiotics such as macrolides, ionophores and tiamulin in liquid manure by HPLC-MS/MS." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375, 942-947.
- [138] Haller, M. Y., Müller, S. R., McArdell, C. S., Alder, A. C., Suter, M. J.-F. (2002). "Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography- mass spectrometry." *Journal of Chromatography A*, 952, 111-120.
- [139] Meyer, M. T., Bumgarner, J. E., Varns, J. L., Daughtridge, J. V., Thurman, E. M., Hostetler, K. A. (2000). "Use of radioimmunoassay as a screen for antibiotics in confined animal feeding operations and confirmation by liquid chromatography/mass spectrometry." *The Science of the Total Environment*, 248, 181-187.

- [140] Höper, H., Kues, J., Nau, H., Hamscher, G. (2002). "Eintrag und Verbleib von Tierarzneimittelwirkstoffen in Böden." *Bodenschutz*, 4, 141-148.
- [141] rom (2003). "Auslöser war ein defektes Ventil - Swist über sieben Kilometer biologisch tot." *Bonner-Generalanzeiger* 01.08.2003.
- [142] Huysman, F., Renterghem, B. V., Verstraete, W. (1993). "Antibiotic-resistant sulfite-reducing *Clostridia* in soil and groundwater as indicator of manuring practices." *Water Air and Soil Pollution*, 69 (3-4), 243-255.
- [143] Schneider, R. J. (1993). "Einsatz von Immunoassays in der Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln - insbesondere Triazinherbiziden - im Boden," *Dissertation*, Technische Universität, München.
- [144] Thurman, E., Goolsby, D. A., Meyer, M. T., Mills, M. S., Pomes, M. L., Koplin, D. W. (1992). "A reconnaissance study of herbicides and their metabolites in surface water of midwestern United States using immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry." *Environmental Science & Technology*, 26, 2440-2447.
- [145] Blanchard, P. E., Lerch, R. N. (2000). "Watershed vulnerability to losses of agricultural chemicals: interactions of chemistry, hydrology, and land-use." *Environmental Science & Technology*, 34, 3315-3322.
- [146] Schneider, R. J., Wollweber, A., Düren-Lancaster, B. (1998). "Balancing the fate of terbuthylazine in a water catchment area by immunochemical screening." *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 70, 59-74.
- [147] Preuß, G., Willme, U., Zullei-Seibert, N. (2001). "Verhalten ausgewählter Arzneimittel bei der künstlichen Grundwasseranreicherung - Eliminierung und Effekte auf die mikrobielle Besiedlung." *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 29 (5), 269-277.
- [148] Verstraeten, I. M., Carr, J. D., Steele, G. V., Thurman, E. M., Bastian, K. C., Dormedy, D. F. (1999). "Surface water-ground water interaction: Herbicide transport into municipal collector wells." *Journal of Environmental Quality*, 28 (5), 1396-1405.
- [149] "Ausländerzahl in Deutschland im Jahr 2002 unverändert." *Pressemitteilung vom 13.03.2003*, Statistisches Bundesamt.
- [150] LUA-Brandenburg (2002). *Ökotoxikologische Bewertung von Humanarzneimitteln in Ökosystemen*, Band 39, LUA Brandenburg, Potsdam, http://www.mlur.brandenburg.de/oe_a/lua_bd39.pdf.
- [151] Scharf, S. (2002). *Arzneimittelwirkstoffe im Zu- und Ablauf von Kläranlagen*. Umweltbundesamt Wien, Wien, ISBN 3-85457-624-2, <http://www.umweltbundesamt.at/fileadmin/site/publikationen/BE201.pdf>.
- [152] Golet, E. M., Alder, A. C., Giger, W. (2002). "Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley watershed, Switzerland." *Environmental Science & Technology*, 36 (17), 3645-3651.

- [153] Flury, M., Leuenberger, J., Studer, B., Jury, W. A., Flühler, H. (1992-1994). "Präferentielle Fliesswege in Ackerböden - ein screening-Test unter Feldbedingungen." *ETH Zürich*, Zürich.
- [154] Lautner, P., Türk, K. "Bodenschutz - Fachinformationen im world wide web - Boden nutzen-Boden schützen." Ministerium für Umwelt und Verkehr Baden-Württemberg (UVM BW) und Landesanstalt für Umweltschutz (LfU)
<http://www.xfaweb.baden-wuerttemberg.de/bofaweb/berichte/tbb04/tbb0443.htm>.
- [155] Schnappinger, P., Usleber, E., Märtlbauer, E., Terplan, G. (1993). "Enzyme immunoassay for the detection of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk." *Food and Agricultural Immunology*, 5, 67-73.
- [156] Fránek, M., Kolár, V., Deng, A., Crooks, S. (1999). "Determination of sulphadimidine (sulfamethazine) residues in milk, plasma, urine and edible tissues by sensitive ELISA." *Food and Agricultural Immunology*, 11, 339-349.
- [157] Färber, H., Skutlarek, D. "Arzneimittelrückstände und endokrin wirksame Stoffe in Trink- und Abwasser." in: *Kooperationsforum Innovation*, Mülheim a. d. Ruhr, 30.03.2004.
- [158] Christian, T., Schneider, R. J., Färber, H. A., Skutlarek, D., Meyer, M. T., Goldbach, H. E. (2003). "Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface water." *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 31 (1), 36-44.
- [159] MUNLV-NRW (2002). "Entwicklung und Stand der Abwasserbeseitigung in Nordrhein-Westfalen." Friedrich, H., Mertsch, V., MUNLV-NRW, Abteilung IV, Düsseldorf,
http://www.munlv.nrw.de/sites/arbeitsbereiche/boden/munlv_abwasserwirtschaft/.
- [160] Deutsches Institut für Normung (1994). "Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze." *DIN 32645*, Beuth-Verlag, Berlin.
- [161] Deutsches Institut für Normung (1986). "Kalibrierung von Analysenverfahren" *DIN 38402, Teil 51*, Beuth-Verlag, Berlin.
- [162] Schmitt, G. (2003). "DINTEST 2003 DE." Institut für Rechtsmedizin und Verkehrsmedizin der Universität, Heidelberg.
<http://www.georgschmitt.net/download/dintest.htm>.
- [163] Akhtar, M. H., Croteau, L. G. (1996). "Microwave extraction of incurred salinomycin from chicken tissues." *Journal of Environmental Science and Health B*, 31 (1), 117-133.
- [164] Higgins, H. C., McEvoy, J. D. (2002). "Accelerated solvent extraction of animal feedingstuffs for microbial growth inhibition screening for the presence of antimicrobial feed additives." *Food Additives and Contaminants*, 19 (9), 819-828.

- [165] Shim, J. H., Lee, M. H., Kim, M. R., Lee, C. J., Kim, I. S. (2003). "Simultaneous measurement of fluoroquinolones in eggs by a combination of supercritical fluid extraction and high pressure liquid chromatography." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 67 (6), 1342-1348.
- [166] Rodbart, D. (1981). "Mathematics and statistics of ligand assays: an illustrated guide." in: *Ligand Assay*, Kangan, J., Clapp, J. J., (Hrsg.), Masson Publishing, New York, 45-101.
- [167] Watanabe, H., Satake, A., Kido, Y., Tsuji, A. (2002). "Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic rapid assay for dihydrostreptomycin in milk." *Analytica Chimica Acta*, 472, 45-53.
- [168] Lee, N., Holtzapple, C. K., Muldoon, M. T., Despnadhe, S. S., Stanker, L. H. (2001). "Immunochemical approaches to the detection of sulfathiazole in animal tissues." *Food and Agricultural Immunology*, 13, 5-17.
- [169] Hack, R., Märtlbauer, E., Terplan, G. (1989). "Production and characterisation of a monoclonal antibody to chloramphenicol." *Food and Agricultural Immunology*, 1, 197-201.
- [170] Nakane, P. K., Kawaoi, A. (1974). "Peroxidase-labeled antibody - a new method of conjugation." *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 22 (12), 1084-1091.
- [171] Märtlbauer, E., Meier, R., Usleber, E., Terplan, G. (1992). "Enzyme immunoassay for the detection of sulfamethazine, sulfadiazine, sulfamethoxyypyridazine and trimethoprim in milk." *Food and Agricultural Immunology*, 4, 219-228.
- [172] Haasnoot, W., Korsrud, G. O., Cazemier, G., Maneval, F., Keukens, H., Nouws, J. (1996). "Application of an enzyme immunoassay for the determination of sulphamethazine (sulphadimidine) residues in swine urine and plasma and their use as predictors of the level in edible tissue." *Food Additives and Contaminants*, 13 (7), 811-821.
- [173] Weller, M. G. (1992). "Strukturelle und kinetische Untersuchungen zur Entwicklung und Optimierung von Hapten-Enzymimmunoassays (ELISAs) am Beispiel der Bestimmung von Triazinherbiziden," *Dissertation*, Technische Universität, München.
- [174] Tataka, J. G., Knapp, M. M., Ressler, C. (1991). "Synthesis and characterization of protein and polylysine conjugates of sulfamethoxazole and sulfanilic acid for investigation of sulfonamide drug allergy." *Bioconjugate Chemistry*, 2 (2), 124-132.
- [175] Muldoon, M. T., Font, I. A., Beier, R. C., Holtzapple, C. K., Young, C. R., Stanker, L. H. (1999). "Development of a cross-reactive monoclonal antibody to sulfonamide antibiotics: evidence for structural conformation-selective hapten recognition." *Food and Agricultural Immunology*, 11, 117-134.
- [176] Markl, J., Lieb, B., Gebauer, W., Altenheim, B., Meissner, U., Harris, J. R. (2001). "Marine tumor vaccine carriers: structure of the molluscan hemocyanins KLH and HtH." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 127 (2), R3-R9.

- [177] Niessner, R., Weller, M. G. (2002). "Abschlussbericht zum Förderprojekt 02-WU9848/9 - Entwicklung von schnellen immunologischen und massenspektrometrischen Methoden zur Kontrolle von Algentoxin-Kontaminationen im Trinkwasser." Deutsch-Australische Kooperation, www.ch.tum.de/wasser/weller/report-algaltoxins.pdf.
- [178] SeqLab (2003). "Firmeninformation zur Standardimmunisierung." Göttingen.
- [179] Deng, A., Himmelsbach, M., Zhu, Q. Z., Frey, S., Sengl, M., Buchberger, W., Niessner, R., Knopp, D. (2003). "Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using ELISA and GC-MS." *Environmental Science & Technology*, 37 (15), 3422-3429.
- [180] Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., Chavez-Eng, C. M. (2003). "Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS." *Analytical Chemistry*, 75 (13), 3019-3030.
- [181] Vanderford, B. J., Pearson, R. A., Rexing, D. J., A., S. S. (2003). "Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals, and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry." *Analytical Chemistry*, 75 (22), 6265-6274.
- [182] Frehse, H., Thier, H. P. (1991). "Die Ermittlung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze bei Rückstandsanalysen nach dem neuen DFG-Konzept." *GIT Fachzeitschrift Labor*, 35 (4), 285-291.
- [183] DFG (1991). "Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln." *Methodensammlung der Arbeitsgruppe "Analytik"*, Verlag Chemie, Weinheim.
- [184] Congdon, R. W., Muth, G. W., Splittgerber, A. G. (1993). "The binding interaction of Coomassie blue with proteins." *Analytical Biochemistry*, 213 (2), 407-413.
- [185] Sapan, C. V., Lundblad, R. L., Price, N. C. (1999). "Colorimetric protein assay techniques." *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29 (2), 99-108.
- [186] Essex. (2002). "Gebrauchsinformation Vetoprim 24 % ad us vet." Essex Animal Health Friesoythe.
- [187] Winckler, C., Grafe, A. (2001). "Use of veterinary drugs in intensive animal production: evidence for persistence of tetracycline in pig slurry." *Journal of Soils and Sediments*, 1, 66-70.
- [188] Kümmerer, K. (1998). "Abbau von Arzneimitteln in Testsystemen und Möglichkeiten zur Emissionsreduktion." *Chemische Stressfaktoren in aquatischen Systemen*, Weigert, B., Steinberg, C., Brüggemann, R., Wasserforschung e.V. (Hrsg.), Berlin, 165-177. <http://www.wasserforschung-berlin.de/schrift/band6/6-kue.pdf>.
- [189] ct-Arzneimittel. (1998). "Gebrauchsinformation doxy 100 von ct."
- [190] Spiegel-online (2003). "Antibiotika fördern Asthma und Allergie." *Spiegel online*, 01.10.2003, <http://www.spiegel.de/wissenschaft/mensch/0,1518.267871,00.htm>.

-
- [191] LGL (2003). "Bayerische Studie weist Antibiotika-Spuren im Trinkwasser nach." *Pressemitteilung*, 029, 1, <http://www.lgl.bayern.de/de/left/presse/2003/029-03.htm>.
- [192] Immer (2003). "Umwelt: Risiken und Nebenwirkungen der Leitung." *GEO Magazin*, 09, http://www.geo.de/GEO/wissenschaft_natur/oekologie/2002_09_GEO_risiken_aus_der_leitung/?SDSID=.
- [193] Zielezny, Y. (2003). "persönliche Mitteilung." Forschungszentrum Jülich, Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre ICG.
- [194] Al-Ahmad, A., Daschner, F. D., Kummerer, K. (1999). "Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37 (2), 158-163.
- [195] Huber, M. M., Canonica, S., Park, G. Y., von Gunten, U. (2003). "Oxidation of pharmaceuticals during ozonation and advanced oxidation processes." *Environmental Science & Technology*, 37 (5), 1016-1024.
- [196] Cemagref "Technologien zur Bewertung und Beseitigung von Antibiotika im Abwasser." Projekt REMPHARMAWATER, <http://www.europa-web.de/europa/03euinf/07eukomm/antibiot.htm>.
- [197] POSEIDON. "Assessment of technologies for the removal of pharmaceuticals and personal care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse." EU-Projekt POSEIDON, <http://www.eu-poseidon.com/>.
- [198] Türk, J., Plöger, J., Kiffmeyer, T. K., Becker, B., Kabasci, S., Schmidt, K. G., Kuss, H. M. (2004). "Bestimmung des Abbaus von persistenten Pharmazeutika mittels HPLC-MS/MS - oxidative Behandlung von Krankenhausabwasser-Teilströmen." *CLB Chemie in Labor und Biotechnik*, 55 (3), 97-99.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Themenkomplex „Antibiotikarückstände in der aquatischen Umwelt“. Es werden dazu relevante Kompartimente und Eintragspfade in die Oberflächengewässer, ausgehend von Gülle und Bodenuntersuchungen, sowie Kläranlagen-zulauf- und -ablaufproben auf Gehalte an Human- und Veterinärantibiotika untersucht. Zentrale Fragestellung war, wie Rückstände in die Gewässer gelangen, welche Zusammenhänge im aquatischen System bestehen, ob die veterinärmedizinische Anwendung einen Einfluss auf die Gehalte hat und welche Risiken oder Problematiken sich aus den Befunden ergeben.

Nach der Vorstellung der untersuchten Klassen, der Wirkungsmechanismen, der Resistenzproblematik, der Darstellung der rechtlichen Grundlagen, der Verbrauchsmengen, der Eintragswege, sowie der abgeschätzten Umweltkonzentrationen, wird die Entwicklung verschiedenster Nachweisverfahren zur Bestimmung von Rückständen in den besagten Matrices beschrieben.

Es wurden Methoden entwickelt und angewandt, die zum einen auf der immunochemischen Bestimmung im ELISA Testformat basieren. Dabei wurden zu existierenden Antikörpern gegen Streptomycin und Sulfadimidin Tracer mit verschiedenen Methoden hergestellt und miteinander verglichen. Letzterer Test wurde zur Messung von Gülle- und Bodenproben auf dieses Veterinärantibiotikum (SDM) verwendet. Des weiteren wurde ausgehend von Immunogensynthese, Immunisierung von Kaninchen und Tracersynthesen ein vollständiger Test für das Humanantibiotikum Sulfamethoxazol entwickelt, mit dem Abwasserproben untersucht werden konnten. Zum anderen wurde ein SPE-Anreicherungsverfahren entwickelt, das in Kombination mit einem LC-MS/MS-Verfahren zur Bestimmung von Antibiotikarückständen in Oberflächengewässern diente.

Ausgehend von Messungen in den Primär-Matrices, wie Abwasser und Gülle konnten Rückstände im Bereich weniger $\mu\text{g/L}$ im Abwasser bzw. weniger mg/L in Gülle (bis zu 19 mg/L) bestimmt (bzw. ausgehend von Oberflächenwasserkonzentrationen hochgerechnet) werden. In den nachfolgenden Kompartimenten diverser Böden (nach zuvor erfolgter Gülleausbringung) konnten ebenfalls Rückstände, allerdings nur noch im $\mu\text{g/kg}$ -Bereich, gefunden werden. In Oberflächenwasser lagen die Konzentration im ng/L -Bereich mit

Höchstwerten von 300 ng/L. Am häufigsten traten Makrolide, Sulfonamide und Lincosamide auf. Dabei konnten Antibiotika sowohl aus der Human-, als auch aus der Veterinär Anwendung gefunden werden, letztere allerdings in deutlich niedrigeren Konzentration von weniger als 10 ng/L (maximal 90 ng/L Tylosin). Daher konnte ein Einfluss der Landwirtschaft auf das Vorkommen von Rückständen in Gewässern nachgewiesen werden, wenngleich dieser Einfluss im Vergleich zum Einfluss der Humananwendung unbedeutend ist. Insgesamt gesehen, konnten die Eintragspfade von Antibiotika in die aquatische Umwelt aber aus beiden Bereichen der Anwendung nachverfolgt werden. Zwischen ländlichen Gebieten und dichter besiedelten Gebieten konnten keine Unterschiede ausgemacht werden. Da der weitaus größte Anteil aus Humanpharmaka besteht, die mit Kläranlagenabflüssen eingetragen werden, ist für die Gehalte der Anteil von Abwasser in den Gewässern bestimmend.

Anhand von Gewässerscreeninguntersuchungen und Zeitreihen konnten interessante Zusammenhänge im aquatischen System erkannt werden:

In den Flüssen besteht eine umgekehrte Proportionalität zwischen den Konzentrationen und den Wasserabflussmengen. Im Gegensatz dazu sind die Konzentrationen umso höher, je höher der Abwasseranteil in den Gewässern ist (direkte Proportionalität). Es wurden, ausgehend von den Konzentrationen im Oberflächenwasser und den Abflussmengen, die Frachten bestimmt. Die Frachten in einem Gewässer korrelieren mit der Anzahl der Einwohner in den Einzugsgebieten, deren Abwässer in die Flüsse und Bäche, oder deren Vorfluter eingeleitet werden. Außerdem sind die Frachten in den Gewässern in den Wintermonaten deutlich höher als in den Sommermonaten, was die Verschreibungssituation im Jahresverlauf widerspiegelt. Anhand der Frachten pro Einwohner wurden Unterschiede in den Flussgebieten deutlich, die auf die unterschiedlichen Abbauleistungen der Kläranlagen hinweisen. Dazu wurde festgestellt, dass die Frachten pro Einwohner, umso höher sind, je schlechter die Fähigkeit der Kläranlagen zur Stickstoffeliminierung ist.

Es konnten also drei große Einflussfaktoren erkannt werden, die gemeinsam das Auftreten von Antibiotikarückständen in unseren Gewässern bestimmen: die Anwendungsseite, die hydrologische Seite und die Eliminationsseite.

Die Bewertung der Ergebnisse zeigte, dass eine negative Beeinflussung der Resistenzsituation bei Bakterien oder eine sonstige Gefährdung durch die gefundenen, niedrigen Konzentrationen in den Umweltkompartimenten der hier untersuchten Boden- und Wasserproben zur Zeit nicht abgeleitet werden kann.

Danksagung

Größter Dank gebührt Herrn PD Dr. R. J. Schneider, in dessen Arbeitsgruppe am Institut für Pflanzenernährung, die Anfertigung dieser Arbeit geschah. Es war für mich ein besonderes Glück, dass ich ihn als „Chef“ haben durfte. Viel mehr als ein Chef, dessen fachliche Unterstützung, Anregungen, gewährte Möglichkeiten und Vertrauen zum Gelingen der Arbeit nicht zu unterschätzen sind, war er ein Freund. Für die harmonische Atmosphäre und die schöne Zeit in seiner Arbeitsgruppe möchte ich ihm besonders danken.

Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. R. Galensa und Herrn Prof. Dr. M. Keusgen für die unkomplizierte Zusammenarbeit und dass sie sich bereitgefunden haben, diese viel zu vielen Seiten zu lesen und anschließend zu begutachten. In diesem Zusammenhang möchte ich den weiteren Mitgliedern der Promotionskommission Herrn Prof. Dr. B. Wiedemann und Herrn Prof. Dr. F. Vögtle danken, die ebenfalls bereit waren, ihre Zeit zu opfern.

Für die sehr gute Kooperation, die fachlichen Anregungen und Diskussionen und besonders für die Messungen per LC-MS/MS möchte ich Herrn D. Skutlarek und Herrn Dr. H. Färber vom Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit in Bonn danken.

Herzlich danken möchte ich auch Frau B. Schmitt für die Hilfe und Anregungen, die sich aus unseren zahlreichen verständnisvollen Unterhaltungen ergaben.

Besonderer Dank gilt schließlich meinen lieben Kollegen in der Arbeitsgruppe FATE, die mich stetig unterstützten und motivierten. Die vielen Diskussionen, Gespräche, Ablenkungen und die sehr gute Zusammenarbeit in diesem freundschaftlichen Umfeld haben erheblich zu einem guten Abschluss der Arbeit beigetragen. Hierzu möchte ich meinen Mitdoktoranden Herrn C. Schneider, Frau T. Hintemann, Herrn M. Hashim und den Diplomanden Frau. H. Behn und Herrn A. Heck danken.