

Texte

**24**  
**07**

ISSN  
1862-4804

## Untersuchungen zum Abflussverhalten von Veterinärpharmaka bei Ausbringung von Gülle auf Ackerland und Weide

- Runoff-Projekt -

Umwelt  
Bundes  
Amt 

Für Mensch und Umwelt

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES  
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,  
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT

Forschungsbericht 202 67 435  
UBA-FB 001016



**Untersuchungen zum  
Abflussverhalten von  
Veterinärpharmaka bei  
Ausbringung von Gülle  
auf Ackerland und Weide  
- Runoff-Projekt -**

von

**Robert Kreuzig**

und

**Sibylla Höltge, Julia Heise, Marit Kolb, Norbert Berenzen,  
Torsten Hahn, Stefan Jergentz, Jörn Wogram, Ralf Schulz**

Technische Universität Braunschweig  
Institut für Ökologische Chemie und Abfallanalytik  
Zoologisches Institut

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

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

Die in der Studie geäußerten Ansichten  
und Meinungen müssen nicht mit denen des  
Herausgebers übereinstimmen.

Herausgeber: Umweltbundesamt  
Postfach 14 06  
06813 Dessau  
Tel.: 0340/2103-0  
Telefax: 0340/2103 2285  
Internet: <http://www.umweltbundesamt.de>

Redaktion: Fachgebiet IV 2.2  
Dr. Jutta Klein-Goedicke

Dessau, Juni 2007

## Berichts-Kennblatt

1. Berichtsnummer UBA-FB	2.	3.
4. Titel des Berichts  <b>Untersuchungen zum Abflussverhalten von Veterinärpharmaka bei Ausbringung von Gülle auf Ackerland und Weide (Runoff-Projekt)</b>		
5. Autor(en), Name(n), Vorname(n) Kreuzig, R. (Projektleiter), Höltge, S., Heise, J., Kolb, M., Berenzen, N., Hahn, T., Jergentz, S., Wogram, J., Schulz, R.		8. Abschlussdatum 31.08.2004
6. Durchführende Institution (Name, Anschrift) Institut für Ökologische Chemie und Abfallanalytik Institut für Zoologie Technische Universität Braunschweig Hagenring 30 D-38106 Braunschweig		10. UFOPLAN-Nr. 202 67 435
		11. Seitenzahl 162
7. Fördernde Institution (Name, Anschrift)  Umweltbundesamt, Postfach 33 00 22, 14191 Berlin		12. Literaturangaben  128
		13. Tabellen 30
		14. Abbildungen 55
15. Zusätzliche Angaben		
16. Zusammenfassung  <p>Im Runoff-Projekt wurde ein mehrstufiges experimentelles Design verfolgt, das Labortests und Testplot-Experimente einschließt, um das Rückstandsverhalten von Veterinärpharmaka in Gülle und güllegedüngten Böden zu untersuchen. Zusätzlich wurden ökotoxikologische Tests mit terrestrischen und aquatischen Testspezies durchgeführt. Testsubstanzen waren Sulfadiazin, Sulfadimidin, Sulfamethoxazol, Acetyl-Sulfamethoxazol, Flubendazol, Fenbendazol und Ivermectin. Auf der Basis von Stabilitätstests in Gülle, wurde Testgülle mit kurzfristig gealterten Rückständen hergestellt und in Labortests zu Abbau und Sorption in Böden eingesetzt, um bereits hier den realen Eintragspfad durch die Gülleausbringung zu berücksichtigen. In den Testplot-Experimenten wurden die Runoff-Austräge der Testsubstanzen von Acker- und Grünlandflächen nach Gülleausbringung und Intensivberegnung ermittelt. Nach der 2-stündigen Beregnung wurden höhere Runoff-Emissionen der Sulfonamide vom Grünland als von der Ackerfläche gefunden. Hier führte die Einarbeitung der Gülle in den Boden zu einer deutlichen Verminderung und Verzögerung der Austräge. Aus diesem Grund wurden auch nur geringe Emissionen der Benzimidazole und Ivermectin von der Ackerfläche festgestellt. Im Oberboden nahmen die Sulfonamid-Konzentrationen rasch ab. Wie die korrespondierenden Labortests belegten, war das auf die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände zurückzuführen. Für die Benzimidazole und Ivermectin waren Konzentrationsabnahmen bis zum Abschluss der Testplot-Studie zu verzeichnen. Relevante Verlagerungstendenzen wurden unter Freilandbedingungen nicht ermittelt, was mit den in Labortests ermittelten Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten und den Laborlysimeter-tests mit Sulfadiazin übereinstimmte.</p>		
17. Schlagwörter Veterinärpharmaka, Testplot-Studie, Oberflächenabfluss (Runoff), Gülle, Boden, Labortestsysteme, Abbau, Sorption		
18. Preis	19.	20.

## Report Cover Sheet

1. Report No. UBA-FB	2.	3.
4. Report Title  <b>Investigations on runoff of veterinary medicinal products from arable and grassland after manure application (Runoff Project)</b>		
5. Autor(s), Family Name(s), First Name(s)  Kreuzig, R. (project leader), Höltge, S., Heise, J., Kolb, M., Berenzen, N., Hahn, T., Jergentz, S., Wogram, J., Schulz, R.		8. Report Date 08/31/2004
6. Performing Organisation (Name, Address) Institute of Ecological Chemistry and Waste Analysis Institute of Zoology Technical University of Braunschweig Hagenring 30 D-38106 Braunschweig		9. Publication Date
7. Funding Agency (Name, Address)  Umweltbundesamt (Federal Environmental Agency) Postfach 33 00 22, 14191 Berlin		10. UFOPLAN-Ref. No. 202 67 435
		11. No. of Pages 162
		12. No. of Reference  128
		13. No. of Tables 30
		14. No. of Figures 55
16. Abstract  <p>In the Runoff Project, a tiered experimental design including laboratory tests and test-plot experiments was applied to investigate the fate of veterinary medicinal products in manure and manured soils. In addition, ecotoxicological tests with terrestrial and aquatic test species were performed. Test substances were sulfadiazine, sulfadimidine, sulfamethoxazole, acetyl-sulfamethoxazole, flubendazole, fenbendazole and ivermectin. Based on stability tests in manure, tests slurries with short-term aged residues were prepared and applied in laboratory tests on degradation and sorption in soils simulating the real entry route via manure application. In testplot-experiments, runoff emissions of the test substances from arable and grassland were studied after manure application and sprinkler irrigation. After the 2-h irrigation periods, higher runoff emissions of sulfonamides were found from grassland than from arable land. Here, delayed emissions were caused by the incorporation of manure into soil via soil cultivation. Thus, only low emissions of benzimidazoles and ivermectin from arable land occurred. In topsoils, sulfonamides disappeared rapidly caused by the formation of non-extractable residues as shown by corresponding laboratory tests. The concentrations of benzimidazoles and ivermectin dropped slowly until the end of the test-plot study. Relevant leaching potentials were not found under field conditions matching the soil/water distribution coefficients determined in batch equilibrium tests and leaching behaviour of sulfadiazine in laboratory lysimeter tests.</p>		
17. Keywords Veterinary medicinal products, test-plot study, runoff, manure, soil, laboratory-test systems, degradation, sorption		
18. Price	19.	20.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zielsetzung des Runoff-Projektes</b>	<b>1</b>
<b>2. Auswahl von Testsubstanzen und Untersuchungsgebiet</b>	<b>5</b>
2.1 Pharmazeutische Testsubstanzen	5
2.2 Standorteigenschaften	8
<b>3. Experimentelles Design</b>	<b>11</b>
3.1 Labortestsysteme	11
3.1.1 Probenahme und Matrix-Charakterisierung	12
3.1.2 Stabilitätstests in Gülle	14
3.1.3 Herstellung von Testgülle	17
3.1.4 Tests zum Abbau in Boden	17
3.1.5 Charakterisierung nicht-extrahierbarer Rückstände in Boden	19
3.1.6 Tests zur Mobilität in Boden	21
3.2 Rückstandsanalytische Methoden	23
3.2.1 Gülleanalytik	25
3.2.2 Wasseranalytik	26
3.2.3 Boden- und Sedimentanalytik	27
3.3 Labortests zur Ökotoxikologie ausgewählter Veterinärpharmaka	28
3.3.1 Terrestrische Testsysteme	29
3.3.2 Aquatische Testsysteme	31
3.4 Testplot-Experimente	36
3.4.1 Einrichten der Testplots	36
3.4.2 Herstellung und Applikation der Testgülle	38
3.4.3 Intensivberegnung und Runoff-Probenahme	39
3.4.4 Freiland-Monitoring	41
<b>4. Rückstandsverhalten von Veterinärpharmaka in Gülle und Boden</b>	<b>43</b>
4.1 Stabilität in Gülle	44
4.1.1 Sulfonamide	44
4.1.2 Benzimidazole	48

4.1.3 Ivermectin	50
4.2 Rückstandssituation in der Testgülle	51
4.3 Abbau in Boden	53
4.3.1 Sulfonamide	54
4.3.2 Benzimidazole	79
4.3.3 Ivermectin	93
4.4 Sorption in Boden	98
4.4.1 Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten	99
4.4.2 Laborlysimetertests mit Sulfadiazin	102
4.4.3 Verlagerungstendenzen unter Freilandbedingungen	103
4.5 Ökotoxizität ausgewählter Veterinärpharmaka	105
4.5.1 Wirkungen in terrestrischen Testsystemen	105
4.5.2 Wirkungen in aquatischen Testsystemen	111
<b>5. Abflussverhalten von Veterinärpharmaka von güllegedüngten Böden</b>	<b>118</b>
5.1 Sulfonamide	119
5.1.1 Abflüsse und Austräge von Ackerplots	119
5.1.2 Abflüsse und Austräge von Grünlandplots	124
5.2 Benzimidazole und Ivermectin	129
<b>6. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen</b>	<b>134</b>
<b>7. Summary and Conclusions</b>	<b>143</b>
<b>8. Acknowledgement</b>	<b>151</b>
<b>9. Literaturverzeichnis</b>	<b>152</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AD-A	Boden Adenstedt, Ackerstandort
AD-G	Boden Adenstedt, Grünlandstandort
Ah-Horizont	humoser Oberboden
Ap-Horizont	Pflughorizont
A-SMZ	Acetyl-Sulfamethoxazol
ASTM	American Society for Testing and Materials
BBA	Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
BSB <sub>5</sub>	biologischer Sauerstoffbedarf in 5 Tagen
CA	chemischer Abbau
C <sub>org</sub>	organische Bodensubstanz
CSB	chemischer Sauerstoffbedarf
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DOC	dissolved organic carbon
DT <sub>50</sub> , DT <sub>90</sub>	disappearance time für 50 % bzw. 90 % der applizierten Chemikalie
EC <sub>50</sub>	effektive Konzentration für 50 % der Testorganismen
EMA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
ER	extrahierbare Rückstände
ERAPharm	Environmental Risk Assessment of Pharmaceuticals
ERAVMIS	Environmental Risk Assessment of Veterinary Medicines in Slurry
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAL	Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig
FEN	Fenbendazol
FEN-SUL	Fenbendazolsulfon
FKZ	Förderkennzeichen
FLD	Fluoreszenz-Detektor
FLU	Flubendazol
H:D	Hell:Dunkel-Rhythmus
HPLC	high performance liquid chromatography
ID	innerer Durchmesser
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IVE	Ivermectin
K <sub>d</sub> , K <sub>OC</sub>	Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten



LC/MS	Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie-Kopplung
LC <sub>50</sub>	letale Konzentration für 50 % der Testorganismen
LUFA	Landwirtschaftliche Forschungs- und Untersuchungsanstalt
M1-M5	nicht identifizierte Umwandlungsprodukte
MA	mikrobieller Abbau
MIN	Mineralisation
nb	nicht bestimmbar
NER	nicht-extrahierbare Rückstände
NOEC	non-observed effect concentration
NW	Boden Nienwohld
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
OX-FEN	Oxfendazol
PA	photoinduzierter Abbau
PCA	photoinduziert-chemischer Abbau
PEC	predicted environmental concentration
PMA	photoinduziert-mikrobieller Abbau
PNEC	predicted-no-effect-concentration
PSM	Pflanzenschutzmittel
PVC	Polyvinylchlorid
RP	reversed-phase
RTLC	radio thin layer chromatography
SDM	Sulfadimidin
SDZ	Sulfadiazin
SMZ	Sulfamethoxazol
TG	Testgülle
TG-R	Testgülle (Rindergülle)
TG-S	Testgülle (Schweinegülle)
TS	Trockensubstanz
TPF	Triphenylformazan
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
U- <sup>14</sup> C	uniform- <sup>14</sup> C-ringmarkiert
UBA	Umweltbundesamt
UVD	UV-Detektor
WK <sub>max</sub>	maximale Wasserkapazität

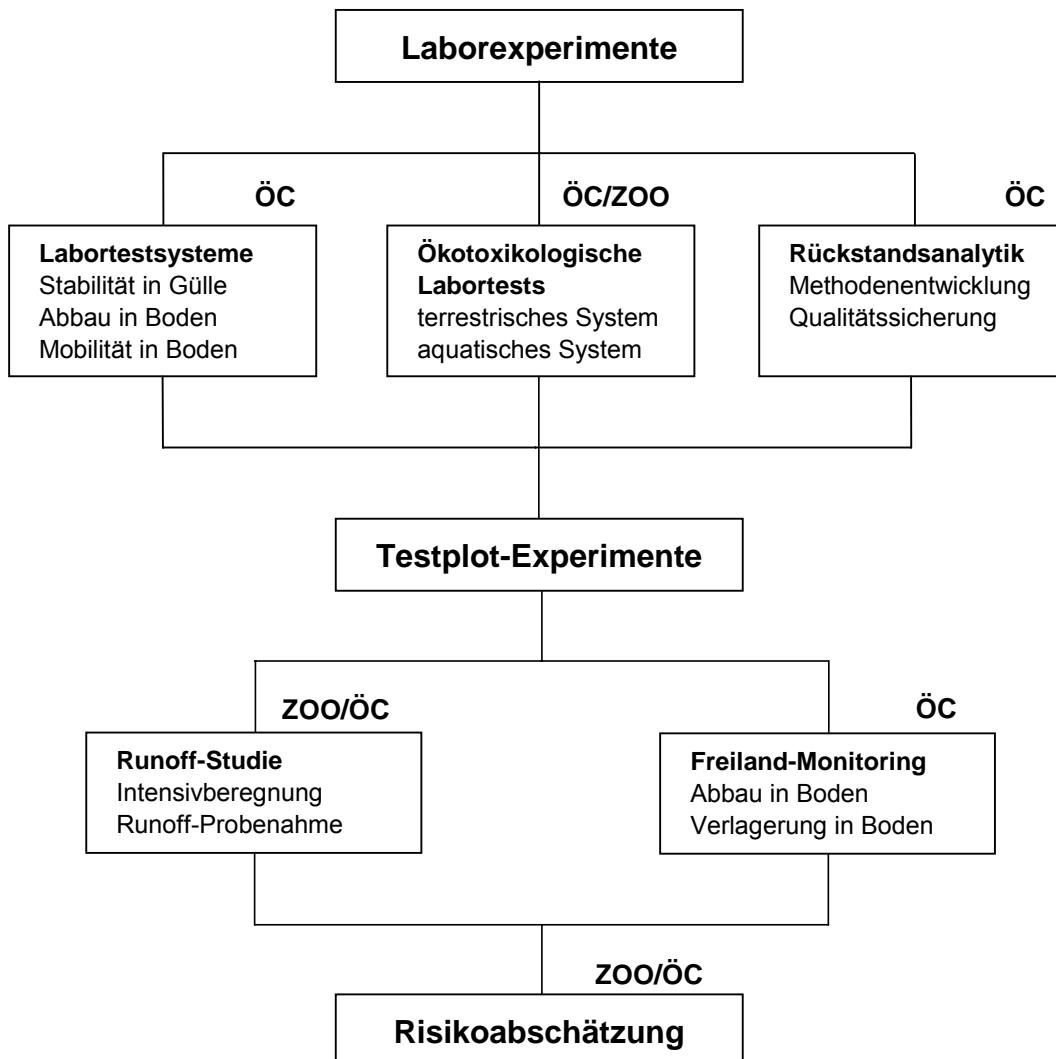
## 1. Zielsetzung des Runoff-Projektes

In der konventionellen Landwirtschaft ist mit der Massentierhaltung ein intensiver Einsatz von Veterinärpharmaka verbunden (FEDESA, 2001, Koschorreck et al., 2002). Bei der regelmäßigen Behandlung von Großvieh gegen Endo- und Ektoparasiten mit Antibiotika und Antiparasitika werden diese Substanzen von den Nutztieren als unveränderte Ausgangsverbindungen und Phase I- bzw. Phase II-Metaboliten wieder ausgeschieden. Sie gelangen mit der Ausbringung von Wirtschaftsdüngern oder direkt beim Weidegang in den Boden und unterliegen dort Abbau und Sorption als konzentrationsbestimmenden Prozessen. In Abhängigkeit von physiko-chemischen Stoff- sowie Bodeneigenschaften können Substanzen so zum einen mit dem Sickerwasser in tiefere Bodenschichten bis in den Grundwasserleiter verlagert werden. Wird das Sickerwasser in Dränagesystemen gefasst, kann durch Interflow ein Eintrag in Oberflächengewässer erfolgen (Kay et al., 2004). Zum anderen ist auch für stärker an die Bodenmatrix sorbierte Substanzen der Eintrag in Fließgewässer durch oftmals unterschätzten Oberflächenabfluss (Runoff) möglich, der bereits bei einer Geländeneigung von  $\geq 2\%$  und einem Starkregenereignis von  $\geq 10\text{ mm d}^{-1}$  von umweltrelevanter Bedeutung sein kann. Während für Pflanzenschutzmittel der Oberflächenabfluss nach Starkregenereignissen als diffuser Eintragspfad in Oberflächengewässer eindeutig identifiziert wurde (House et al., 1992, Liess et al., 1999, Schulz und Liess, 2001, Schulz et al., 2001), fehlten solche Untersuchungen für Veterinärpharmaka bei Beginn dieses Forschungsvorhabens<sup>1</sup> im April 2002.

Um im Runoff-Projekt Erkenntnisse zum Abflussverhalten von ausgewählten Veterinärpharmaka von güllegedüngten Acker- und Grünlandböden nach Intensivberegnung zu erarbeiten, wurde vom Institut für Ökologische Chemie und Abfallanalytik in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Ökologie des Zoologischen Institutes, beide Technische Universität Braunschweig, ein mehrstufiges Versuchsdesign unter Freiland- und Laborbedingungen entworfen (**Abb. 1.1**). Am Standort Adenstedt, Ambergau, Niedersachsen, wurden so 3 Testplot-Serien im Oktober 2002 (Serie 1), April 2003 (Serie 2) und September 2003 (Serie 3) durchgeführt. Für diese Runoff-Studie wurden Testplots auf einer Acker- und auf einer Grünlandfläche eingerichtet.

---

<sup>1</sup> kurz: Runoff-Projekt



**ÖC:** Institut für Ökologische Chemie und Abfallanalytik; **ZOO:** Zoologisches Institut

**Abb. 1.1: Mehrstufiges Versuchsdesign zur Ermittlung des Abfluss- und Rückstandsverhaltens von Veterinärpharmaka in güllegedüngten Böden**

Die Veterinärpharmaka wurden als kurzfristig gealterte Rückstände in Rinder- bzw. Schweinegülle (Testgülle)<sup>2</sup> auf die Bodenoberfläche der Testplots aufgebracht. Entsprechend der Düngeverordnung (1997) wurde die Testgülle auf den Ackerplots zeitnah zur Ausbringung mit dem Grubber in den Boden eingearbeitet, bevor sich die Intensivberegnung anschloss. Dagegen wurden die Grünlandplots direkt nach der Gülle-

<sup>2</sup> "Testgülle" bezeichnet Gülleproben, die mit einer Testsubstanz oder einem Testsubstanzgemisch dotiert und zur kurzfristigen Alterung der Rückstände gelagert wurden.

ausbringung berechnet. Mit dieser 2-stündigen Intensivberechnung sollte das potentielle Abflussverhalten der Sulfonamide Sulfadiazin, Sulfadimidin und Sulfamethoxazol, der Benzimidazol-Antiparasitika Flubendazol und Fenbendazol sowie des Makrolid-Antiparasitikums Ivermectin erfasst werden. Die Beprobung des Oberflächenabflusses in 5-10 min-Intervallen ermöglichte darüber hinaus die Beschreibung einer zeitaufgelösten Austragsituation. Die zu Anfang der Berechnungsperiode ermittelten Runoff-Austräge konnten damit auch realistischen Starkregenereignissen zugeordnet und das Risiko diffuser Stoffeinträge in Oberflächengewässer abgeschätzt werden.

Die Durchführung dieser Testplot-Serien setzte zum einen die Entwicklung rückstandsanalytischer Methoden für den Nachweis von Veterinärpharmaka in den Probenmatrizes Gülle, Wasser, Sediment und Boden voraus. Zum anderen galt es, das Rückstandsverhalten der Veterinärpharmaka in Gülle und Boden unter Laborbedingungen zu untersuchen. In den hierfür eingesetzten Labortestsystemen wurden die Testsubstanzen bevorzugt als <sup>14</sup>C-markierte Radiotracer appliziert, um deren Verhalten und Verbleib in den zu untersuchenden Gülle- und Bodenmatrizes detailliert unter Berücksichtigung von Mineralisation sowie Bildung extrahierbarer und nicht-extrahierbarer Rückstände bilanzieren zu können. Im Runoff-Projekt stellten diese Labortests damit eine wesentliche Grundlage für die Bewertung des Rückstandsverhaltens von Veterinärpharmaka in Gülle und Boden dar. Zusammen mit den Ergebnissen aus dem ebenfalls vom Umweltbundesamt geförderten und im Institut für Ökologischen Chemie und Abfallanalytik, Technische Universität Braunschweig, zeitnah bearbeiteten Forschungsvorhabens "Verhalten von in der Umwelt vorkommender Pharmaka und ihren Metaboliten in Modelltestsystemen – Teil 2: Modellsystem Boden"<sup>3</sup> dar (Kreuzig et al., 2005a), liegt nun eine breitere Datenbasis zum Rückstandsverhalten von Human- und Veterinärpharmaka in Böden vor.

Im Rahmen der mehrstufigen Untersuchungen waren im ersten Ansatz Basisdaten zur Sorption und mikrobiellen Abbaubarkeit der Testsubstanzen in Böden zu erarbeiten. In Anlehnung an die Richtlinien von BBA (1986a, b) und OECD (1981a, b, 2000a, 2002a) wurden die Testsubstanzen in Standardlösungen (Standard-Applikation) zu den zu untersuchenden Bodenproben dotiert und Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten ( $K_d$ - bzw.  $K_{OC}$ -Werte) sowie Abbauraten ( $DT_{50}$ - bzw.  $DT_{90}$ -Werte) ermittelt. In Ergänzung hierzu wurden für die einzelnen Testsubstanzen auch Toxizitätstests mit unterschiedli-

---

<sup>3</sup> kurz: Boden-Projekt (FKZ 201 67 401/02)

chen Testorganismen in terrestrischen und aquatischen Testsystemen durchgeführt (DIN, 2002, OECD, 2000b). In einem zweiten, spezifischeren Ansatz waren zusätzlich chemische und photoinduzierte Abbauprozesse zu erfassen. Im dritten Ansatz war der praxisnahe Eintragspfad in Böden über Gülle zu berücksichtigen. Nach Stabilitätstests der Testsubstanzen in Rinder- bzw. Schweinegülle wurde Testgülle mit definiert gealterten Veterinärpharmaka hergestellt und in den Labortestsystemen eingesetzt (Testgülle-Applikation). Sowohl nach Standard- als auch nach Testgülle-Applikation galt es ferner, die in den Abbautests gebildeten nicht-extrahierbaren Rückstände chemisch sowie biologisch bezüglich der Bindungsstärke und der Remobilisierung durch sequentielle Extraktionstechniken bzw. verschiedene Testorganismen zu charakterisieren (Heise et al., 2006, Kolb et al., 2006). Die Testplot-Studien zum Oberflächenabfluss wurden auch zur Untersuchung des Abbau- und Verlagerungsverhalten der ausgewählten Veterinärpharmaka in güllegedüngten Böden unter Freilandbedingungen herangezogen, indem die Probenahmen bis in 90 cm Bodentiefe in einem Zeitraum bis 663 Tagen durchgeführt wurden.

## 2. Auswahl von Testsubstanzen und Untersuchungsgebiet

### 2.1 Testsubstanzen

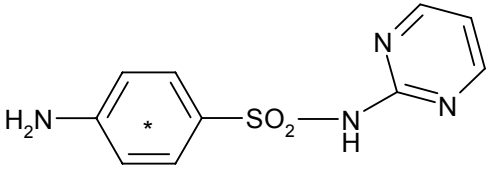
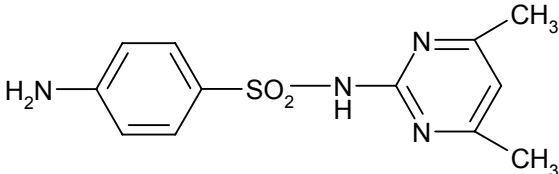
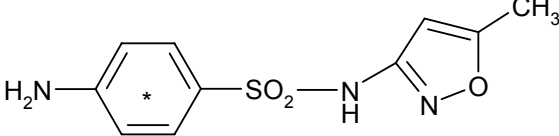
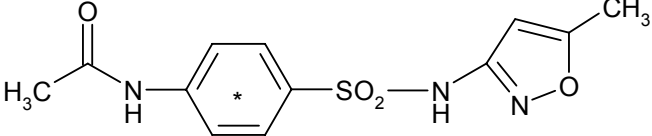
Für die im Rahmen des Runoff-Projektes durchgeführten Untersuchungen kamen 6 Veterinärpharmaka und 1 korrespondierender Metabolit zum Einsatz. Bei der Auswahl der Testsubstanzen galten folgende Kriterien:

- Aufgrund der jährlichen Anwendungsmengen in der Intensivtierhaltung sind für die Testsubstanzen relevante Einträge in Wirtschaftsdünger anzunehmen.
- Die Testsubstanzen stammen aus unterschiedlichen Indikationsgruppen.
- Die Stoffauswahl beinhaltet Strukturanaloga und einen relevanten Metaboliten.
- Für die Labortests sollten die Testsubstanzen möglichst als  $^{14}\text{C}$ -markierte Radiotracer verfügbar sein, um eine detaillierte Betrachtung des Rückstandsverhaltens in Gülle und Boden zu ermöglichen.

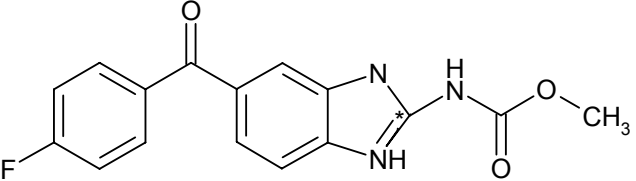
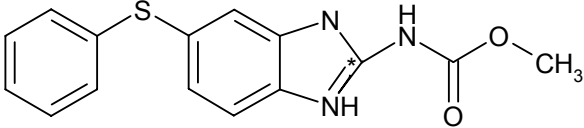
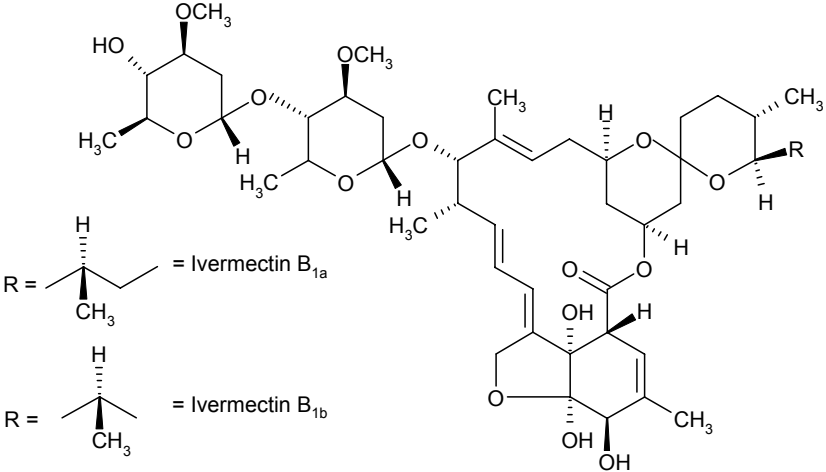
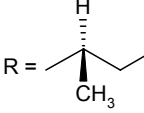
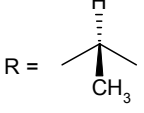
Aus der Gruppe der Antibiotika wurden diesbezüglich die Sulfonamide **Sulfadiazin** (SDZ), **Sulfadimidin** (SDM) und **Sulfamethoxazol** (SMZ) ausgewählt, deren Strukturen in **Tab. 2.1** dargestellt sind. Sulfadiazin und Sulfamethoxazol standen im Rahmen dieser Untersuchungen als phenylring- $^{14}\text{C}$ -markierte Radiotracer zur Verfügung. Nach Winckler und Grafe (2000) wurden im Jahr 1997 allein im Weser-Ems-Gebiet ca. 6200 kg Sulfadiazin sowie ca. 5900 kg Sulfadimidin tierärztlich verschrieben. Sulfamethoxazol wird neben der Behandlung von Rindern und Geflügel überwiegend in der Humanmedizin verabreicht (Börner, 1997). Unter diesem Gesichtspunkt wurde diese Testsubstanz bereits im Boden-Projekt untersucht (Kreuzig et al. 2005a) und stellt die Schnittstelle zwischen beiden Forschungsvorhaben dar, über die neben der landwirtschaftlichen Nutzung von Klärschlamm auch die Ausbringung von Gülle als möglicher Eintragspfad für diese Substanz in Böden betrachtet werden kann. Entsprechendes gilt für den korrespondierenden Metaboliten **Acetyl-Sulfamethoxazol** (A-SMZ), der in den Labortestsystemen ebenfalls als  $^{14}\text{C}$ -markierter Radiotracer eingesetzt wurde. Für Acetyl-Sulfamethoxazol konnte so überprüft werden, inwieweit aus dieser Testsubstanz durch hydrolytische Spaltung in Gülle bzw. Boden wieder Sulfamethoxazol gebildet wird. Diese Reaktion wurde bereits für Acetyl-Sulfadimidin in Böden (Langhammer, 1989, Langhammer et al., 1988) und für die Acetyl-Metaboliten anderer Sulfonamide in

Muskelgewebe von Schweinen (Balizs et al., 1994) nachgewiesen.

**Tab. 2.1: Strukturen der eingesetzten Sulfonamid-Derivate**

Testsubstanz	Strukturformeln
<p><b>Sulfadiazin (SDZ)</b></p> <p>N<sup>1</sup>-(2-Pyrimidinyl)-sulfanilamid</p>	 <p>[Phenylring-U-<sup>14</sup>C]-Sulfadiazin</p>
<p><b>Sulfadimidin (SDM)</b></p> <p>N<sup>1</sup>-(4,6-Dimethyl-2-pyrimidinyl)-sulfanilamid</p>	
<p><b>Sulfamethoxazol (SMZ)</b></p> <p>N<sup>1</sup>-(5-Methyl-3-isoxazolyl)-sulfanilamid</p>	 <p>[Phenylring-U-<sup>14</sup>C]-Sulfamethoxazol</p>
<p><b>Acetyl-Sulfamethoxazol (A-SMZ)</b></p> <p>N<sup>4</sup>-(3-Acetyl-)N<sup>1</sup>-(5-methyl-3-isoxazolyl)-sulfanilamid</p>	 <p>[Phenylring-U-<sup>14</sup>C]-Acetyl-Sulfamethoxazol</p>

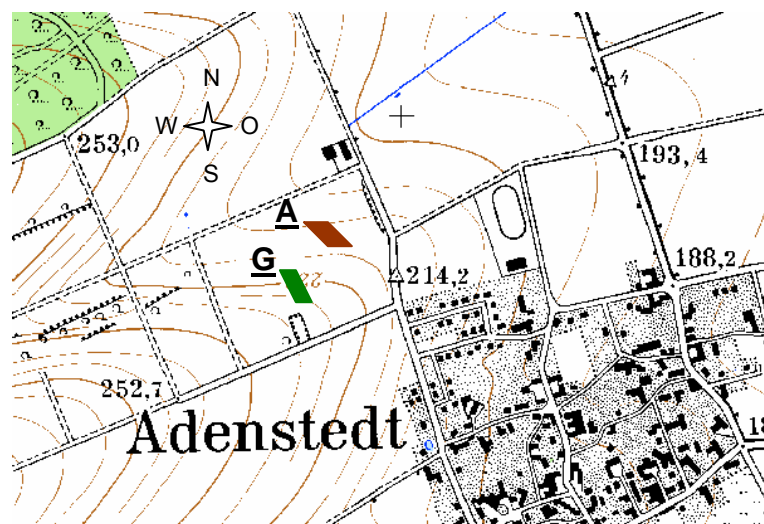
Tab. 2.2: Strukturen der eingesetzten Antiparasitika

Testsubstanz	Strukturformeln
<p><b>Flubendazol (FLU)</b></p> <p>Methyl-[5-(4-fluorbenzoyl)-1<i>H</i>-benzimidazol-2-yl]-carbamat</p>	 <p>Methyl-[5-(4-fluorbenzoyl)-1<i>H</i>-benzimidazol-2-<sup>14</sup>C-yl]-carbamat</p>
<p><b>Fenbendazol (FEN)</b></p> <p>Methyl-5-(phenylthio)-benzimidazol-2-yl-carbamat</p>	 <p>Methyl-5-(phenylthio)-1<i>H</i>-benzimidazol-2-<sup>14</sup>C-yl]-carbamat</p>
<p><b>Ivermectin (IVE)</b></p> <p>22,23-Dihydro-avermectin</p>	 <p>R =  = Ivermectin B<sub>1a</sub></p> <p>R =  = Ivermectin B<sub>1b</sub></p>

Aus der Gruppe der Antiparasitika wurden die strukturanalogen Benzimidazole **Flubendazol** und **Fenbendazol** sowie das Makrolid-Antiparasitikum **Ivermectin** ausgewählt (Tab 2.2). Für das Weser-Ems Gebiet geben Winckler und Grafe (2000) für 1997 Aufwandmengen von 423 kg Flubendazol und 181 kg Fenbendazol an. Im Gegensatz



zu den Sulfonamiden, für die bereits erste Untersuchungen zum Umweltverhalten existieren (Winckler und Grafe, 2000, Langhammer, 1989, Hamscher et al., 2000), liegen bisher keine vergleichbaren Daten für die Benzimidazole vor. Während beide Benzimidazol-Derivate für den Einsatz in den Labortestsystemen als  $^{14}\text{C}$ -markierte Radiotracer zur Verfügung standen, konnten die Tests zu Abbau und Sorption von Ivermectin in Gülle und Böden nur rückstandsanalytisch begleitet werden. Auch wenn in der Weser/Ems-Studie für dieses Makrolid-Antiparasitikum nur Verschreibungsmengen von 6 kg in 1997 angegeben werden (Winckler und Grafe, 2000), wurde das Rückstandsverhalten von Ivermectin vom Einfluss auf den Dungabbau (Madsen et al., 1990, Chapman et al., 2003) bis zum Abbauverhalten in Boden (Halley et al., 1989a, b) bereits weitgehend untersucht. Es war deswegen konsequent, diese Testsubstanz auch in die Untersuchungen zum Abflussverhalten einzubeziehen.



**Abb. 2.1:** Untersuchungsgebiet Adenstedt mit **A**: Ackerfläche und **G**: Grünlandfläche

## 2.2 Standorteigenschaften

Das Untersuchungsgebiet Adenstedt liegt in der Landschaft Ambergau im südwestlichen Harzvorland, Niedersachsen, in einer Entfernung zu Braunschweig von ca. 70 km. Die Versuchsfelder der Acker- und Grünlandflächen befinden sich in einer Catena in Nord/Süd-Ausrichtung (**Abb. 2.1**). Bei Hangneigungen von 2-10 % und anstehenden

schluffigen Tonböden, die gegenüber Sandböden eine geringere Infiltration des Beregnungswassers und damit einen höheren Oberflächenabfluss nach Starkregenereignissen zeigen, sind hier Oberflächenausträge von Veterinärpharmaka-Rückständen aus güllegedüngten Böden prinzipiell möglich.

**Tab. 2.3: Physiko-chemische Eigenschaften der untersuchten Bodenproben**

Standort	Adenstedt 1	Adenstedt 2	Nienwohde
Abkürzung	AD-A	AD-G	NW
Landschaft	Ambergau	Ambergau	Lüneburger Heide
Vegetation	Weizen	Grünland	Kartoffel
Bodentyp	Parabraunerde	Parabraunerde	Braunerde
Bodenart	schluffiger Ton	schluffiger Ton	schluffiger Sand
Sand [%]	5	2	77
Schluff [%]	56	59	19
Ton [%]	39	39	4
pH (CaCl <sub>2</sub> )	6.9	4.5	5.4
WK <sub>max</sub> [%]	42.5	48.0	26.6
C <sub>org</sub> [%]	1.6	3.0	0.8
O <sub>2</sub> -Zehrung <sup>#</sup> [mg 100 g <sup>-1</sup> TS h <sup>-1</sup> ]	2.1	3.3	0.4
C <sub>mikrobielle Biomasse</sub> [%]	3.7	3.1	1.4

<sup>#</sup> gemessen als substratinduzierte Respiration (SIR) (BBA, 1990)

Die Böden von Acker- und Grünlandflächen dieses Untersuchungsgebietes stellen typische Vertreter von Parabraunerde-Gebieten dar. Ihre Eigenschaften sind in **Tab. 2.3** aufgelistet. Da das Rückstandsverhalten der untersuchten Testsubstanzen unter Freilandbedingungen einen Schwerpunkt des Runoff-Projektes darstellte, war es auch konsequent, die an diesem Untersuchungsgebiet entnommenen Bodenproben in den einzelnen Labortestsystemen einzusetzen. Um einen weiteren Boden mit deutlich unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften in diese Tests einzubeziehen, wurde auf einen schluffigen Sand zurückgegriffen, der bereits für Untersuchungen zum

Rückstandsverhalten von Pflanzenschutzmitteln im SFB 179 "Wasser- und Stoffdynamik in Agrarökosystemen" (Dathe et al., 1996, Finnern et al., 1996, Kreuzig, 1998) und von Humanpharmaka im vom Umweltbundesamt geförderten Boden-Projekt (Kreuzig et al., 2005a) in Labortests bzw. Freilandstudien Berücksichtigung fand. Dieser Boden wird für Abbautests in der OECD-Richtlinie 307 (OECD, 2002a) zwar nicht unmittelbar wegen eines geringfügig niedrigeren Tongehaltes empfohlen, doch erfüllt dieser das dort genannte Kriterium von  $C_{\text{mikrobielle Biomasse}} > 1 \%$ . Im Vergleich zu den Böden aus Adenstedt wurde hier mit einer Sauerstoff-Zehrung von nur  $0.4 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ TS h}^{-1}$  allerdings die geringste mikrobielle Aktivität der untersuchten Bodenproben festgestellt. Mit dieser Auswahl wurde damit insgesamt ein breites Spektrum der in Deutschland landwirtschaftlich genutzten Böden abgedeckt, die auch eine weitgehende Ähnlichkeit zu europäischen Referenzböden, wie z.B. EUROSOIL 4 (4 % Sand, 76 % Schluff, 20 % Ton,  $C_{\text{org}}$ : 1.6 %, pH 6.8; Gawlik et al., 1999) bzw. LUFA 2.2 (73 % Sand, 19 % Schluff, 8 % Ton,  $C_{\text{org}}$ : 2.3 %, pH 5.8; LUFA, 2003) zeigen.

### 3. Experimentelles Design

#### 3.1 Labortestsysteme

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

Zur Ermittlung entsprechender Kenndaten für die ausgewählten Testsubstanzen ist der Einsatz dieser als  $^{14}\text{C}$ -markierte Radiotracer in Labortestsystemen erforderlich. Die Ergebnisse aus diesen Labortests dienen so auch als Grundlage für die Bewertung der Ergebnisse aus der Runoff-Studie zum Abfluss- und Rückstandsverhalten der untersuchten Veterinärpharmaka unter Freilandbedingungen. Ergänzt wurde diese Datenbasis um Ergebnisse aus Labortests zur terrestrischen und aquatischen Ökotoxizität, die eine weitere Grundlage für die Bewertung des Rückstandsverhaltens in Böden bzw. der Runoff-bedingten Stoffausträge darstellen. Diese Aspekte, gefolgt von den methodischen Beschreibungen zum Freiland-Monitoring, werden deswegen in diesem Kapitel zusammen mit der Entwicklung rückstandsanalytischer Methoden der eigentlichen Durchführung der Runoff-Studie vorangestellt. Detaillierte Angaben zum angewendeten Methoden-katalog werden von Höltge (2005), Kreuzig und Höltge (2005) und

Kreuzig et al. (2003, 2005b) ausgeführt.

### **3.1.1 Probenahme und Matrix-Charakterisierung**

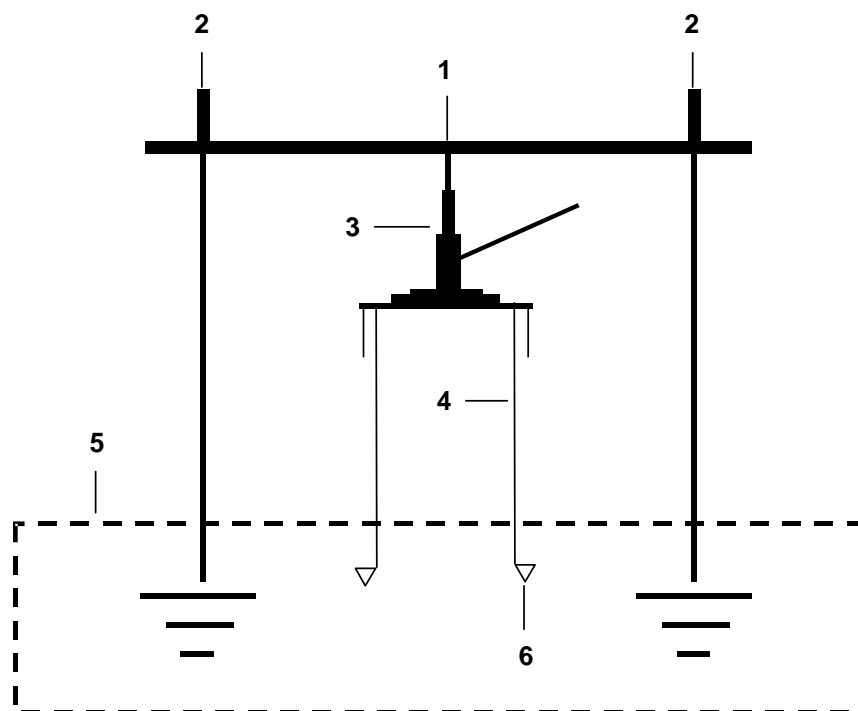
#### **Gülleproben**

Da verabreichte Veterinärpharmaka mit der Ausbringung von Wirtschaftsdüngern aus der Intensivtierhaltung in den Boden eingetragen werden können, ist deren Abbauverhalten während der Güllelagerung von besonderem Interesse. Hierzu wurden entsprechend eines neu entwickelten Versuchsdesigns Stabilitätstests durchgeführt. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde Testgülle mit definiert gealterten Veterinärpharmaka zum Einsatz in den Labortests und der Runoff-Studie hergestellt. Die hierfür verwendeten Gülleproben wurden in mehreren Chargen von der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL; Braunschweig) bezogen. Dabei wurde für die Rindergülle ein durchschnittlicher Trockensubstanz-Gehalt von 12 % mit einem Gehalt an organischer Substanz von 36 % sowie ein pH von 7.5 ermittelt. Die verwendete Schweinegülle zeichnete sich durch einen Gehalt an Trockensubstanz von 7 % sowie einen durchschnittlichen pH von 7.4 aus. Die mikrobielle Aktivität beider Güllematrizes wurde mittels substratinduzierter Respiration (SIR) ermittelt (BBA, 1990). Mit Werten für die Sauerstoffzehrung von 6.8 bzw. 13.6 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> stellte die Schweinegülle die mikrobiell aktivere Matrix dar. Eine weitergehende Charakterisierung der Gülleproben, wie z.B. Redoxpotential, BSB<sub>5</sub>, CSB, Stickstoffgehalt, wurde nicht vorgenommen.

#### **Bodenproben**

Für die Laborbatchexperimente zur Abbaubarkeit der ausgewählten Testsubstanzen sowie für die Ermittlung ihrer Mobilität in Böden mittels Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten wurden aus dem Oberboden (0-5 cm der Ap- bzw. Ah-Horizonte) gestörte Bodenproben entnommen. Einzelproben wurden zu Mischproben vereinigt und durch Sieben < 2 mm homogenisiert, anschließend aliquotiert und bis zum Einsatz in den Labortestsystemen bei -20 °C gelagert. Vor Beginn jeder Abbautestserie wurden die Bodenproben bei Raumtemperatur aufgetaut und bis zum Start regelmäßig durch Befuchten und Mischen konditioniert, um ein Austrocknen zu verhindern und so die bodeninhärente mikrobielle Aktivität zu erhalten. Der Wassergehalt der Bodenproben wurde auf ca. 40 % der maximalen Wasserkapazität eingestellt. Neben dem Boden-pH

und der Trockensubstanz wurde die mikrobielle Bodenaktivität mittels SIR ermittelt (s. **Tab. 2.3**, S.9) (Anderson und Domsch, 1987, BBA, 1990). Zur Erfassung des chemischen Abbaues der Testsubstanzen wurden die verwendete Bodenproben zuvor im Autoklaven an 3 aufeinanderfolgenden Tagen 2 x 20 min bei 140 °C und  $3 \times 10^5$  Pa mikrobiell inaktiviert. Eine Bodenprobe galt dann als mikrobiell inaktiv, wenn die Sauerstoffzehrung  $< 0.1 \text{ mg O}_2 \text{ 100 g}^{-1} \text{ TS h}^{-1}$  war.

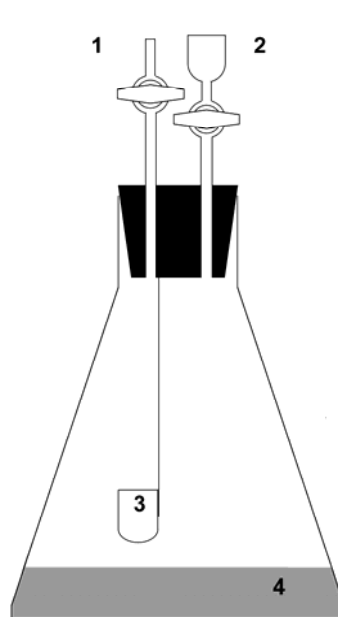


1: Drucktraverse, 2: Erdanker, 3: Hydraulikheber, 4: PVC-Rohr, 5: Bodenoberfläche, 6: Stechring

**Abb. 3.1: Hydraulisches Entnahmesystem für Bodenmonolithen (Nordmeyer und Aderhold, 1994, Wang et al., 1998)**

Über die Abschätzung der Mobilität der Testsubstanzen in Böden anhand von in Batch-Equilibrium-Tests ermittelten Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten ( $K_{d+}$ ,  $K_{OC}$ -Werte) hinaus wurden für die Untersuchung der Verlagerung von Sulfadiazin auf der Weizenstoppelfläche in Adenstedt 3 ungestörte Bodenmonolithen (30 cm Höhe, 15 cm innerer Durchmesser) entnommen. Mittels eines hydraulischen Entnahmesystems wurde hierzu jeweils ein entsprechendes PVC-Rohr zusammen mit einem Metall-Stechring in den

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



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

**Abb. 3.2: Batchapparatur für Abbautests von  $^{14}\text{C}$ -markierten Chemikalien in Gülle und Boden**

### 3.1.2 Stabilitätstests in Gülle

Aus der stoffspezifischen Stabilität von Veterinärpharmaka während der Güllelagerung ergibt sich die Umweltrelevanz der mit der Gülleausbringung verbundenen möglichen Einträge in Acker- und Grünlandböden. Deswegen wurde im "Runoff-Projekt" die Entwicklung eines Labortestsystems in Anlehnung an Tests zur Bioabbaubarkeit von

Chemikalien in Böden (BBA, 1986a, OECD, 1981a, 2002a) initiiert, in dem die Stabilität von Veterinärpharmaka während der Güllelagerung unter Laborbedingungen studiert werden kann. Ähnliche Tests zur Abbaubarkeit von Tetracyclinen in Gülle wurden auch von Kühne et al. (2000) und Loke et al. (2003) beschrieben, nur dass dort diese Tests ausschließlich rückstandsanalytisch begleitet wurden.

In den hier durchgeführten Stabilitätstests wurden die Testsubstanzen mit Ausnahme von Ivermectin als  $^{14}\text{C}$ -markierte Radiotracer in einer geschlossenen Batchapparatur (**Abb. 3.2**) eingesetzt. Zu 50 g Gülle wurden 50-100  $\mu\text{L}$  der Standardlösungen (0.05-0.08 MBq) dotiert, woraus sich in Abhängigkeit von der jeweiligen spezifischen Radioaktivität der eingesetzten Radiotracer Ausgangskonzentrationen von 200-2950  $\mu\text{g kg}^{-1}$  Gülle ergaben; die Detailangaben für die einzelnen Radiotracer sind in **Tab. 3.1** aufgelistet.

**Tab. 3.1: Eingesetzte  $^{14}\text{C}$ -markierte Radiotracer-Urstandards**

Radiotracer	Lösungsmittel	spezifische Aktivität [MBq mmol $^{-1}$ ]	Reinheit [%]	Konzentration [Bq $\mu\text{L}^{-1}$ ]	Konzentration [ $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ]	Dotierung [ $\mu\text{g kg}^{-1}$ ] <sup>#</sup>
SDZ	CH <sub>3</sub> CN	814	94	1427	0.44	440
SMZ	CH <sub>3</sub> CN	148	98	1437	2.64	2640
A-SMZ	CH <sub>3</sub> CN	148	99	1540	2.95	2950
FLU	DMSO	120	99	643	1.67	2505
FEN	DMSO	1773	100	5981	1.01	200*

<sup>#</sup>: Dotierung der Gülle- bzw. Bodenproben

\*: resultiert aus der Dotierung des Arbeitsstandards in Acetonitril (1196 Bq  $\mu\text{L}^{-1}$  entsprechend 0.20  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ )

Geringere Dotiervolumina zur Einstellung niedrigerer Ausgangskonzentrationen konnten nicht appliziert werden, da sonst eine gleichmäßige Verteilung der Testsubstanzen in den Gülleproben nicht hätte gewährleistet werden können. Um eine Beeinträchtigung der gülleinhärenten mikrobiellen Aktivität durch das eingesetzte Acetonitril weitestgehend zu verhindern, wurden die Proben nach Dotierung für 15 min zum Abdampfen des Lösungsmittels offen stehen gelassen. Da  $^{14}\text{C}$ -Flubendazol aufgrund seiner geringen spezifischen Radioaktivität als in Dimethylsulfoxid gelöster Urstandard einge-



setzt werden musste, erfolgte hier im ersten Schritt die Dotierung von Seesandproben, denen dann im zweiten Schritt die zu untersuchenden Gülle- bzw. Bodenproben zugegeben wurden.

Die Inkubation dieser Ansätze erfolgte bei  $20 \pm 1$  °C, die Inkubationsintervalle waren in der Regel 0, 1, 3, 7, 28, 72 und 102 Tage. Alle 3-4 Tage wurde die Kaliumhydroxid-Lösung zur Ermittlung der  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid-Freisetzung als Maß für die Mineralisation ausgetauscht. Gleichzeitig wurde ein Gasaustausch vorgenommen. Spätere Untersuchungen mit Messungen der Milieubedingungen während der Inkubation zeigten, dass in der gesamten Inkubationsperiode anaerobe Milieubedingungen vorherrschen (Kreuzig et al., 2006). Für die analytische Qualitätssicherung wurden für jeden Batchtest Bilanzen unter Berücksichtigung der Mineralisation sowie der Bildung extrahierbarer und nicht-extrahierbarer Rückstände aufgestellt. Ferner wurden die Tag-7-, Tag-28- und Tag-102-Ansätze in Doppel- bzw. Mehrfachbestimmungen durchgeführt.

Am Ende jedes Inkubationsintervalls wurden die Gülleproben einer Schüttelextraktion über Nacht mit 100 mL Ethylacetat unterzogen (Andersson und Pålsheden, 1991, Koinecke et al., 1994). Dieses Lösungsmittel zeigte in Vorversuchen gegenüber Methanol für alle Testsubstanzen mit Wiederfindungsraten von durchschnittlich 96 % gegenüber 58 % die deutlich höhere Extraktionseffizienz. Zur weiteren Kontrolle der Extraktionseffizienz von Ethylacetat wurden die Tag-102-Proben zusätzlich mit einem Gemisch aus 150 mL Methanol und 600  $\mu\text{L}$  konzentrierter Salzsäure behandelt. Diese Nachextraktion gab gleichzeitig Hinweise auf die Bindungsstärke der in den Gülleproben gebildeten nicht-extrahierbaren Rückstände. Die Extrakte wurden getrennt mittels Rotationsverdampfer aufkonzentriert und 10-1000  $\mu\text{L}$ -Aliquote mit 10 mL des Szintillationscocktails Quicksafe N versetzt und die Radioaktivität mittels Flüssigszintillationszähler gemessen. Mittels Radio-Dünnschichtchromatographie (RTLC) folgte für die extrahierbaren Fraktionen eine Differenzierung zwischen applizierter Ausgangsverbindung und gebildeten Metaboliten. Die extrahierte Güllematrix wurde aufgrund ihres hohen Wassergehaltes mit Seesand vermischt, getrocknet und dann durch Mahlen homogenisiert. Schließlich wurden 200 mg-Aliquote mit Cellulose vermischt und in einem Oxidizer verbrannt. Das durch die Verbrennung freigesetzte  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid wurde in 15 mL des Szintillationscocktails Oxysolve-C400 aufgefangen und mittels Flüssigszintillationszählung zur Bestimmung der nicht-extrahierbaren Rückstände gemessen.

### 3.1.3 Herstellung von Testgülle

Auf der Basis der durchgeführten Stabilitätstests wurde Testgülle mit definiert gealterten Veterinärpharmaka hergestellt, um auf diesem Weg die Eintragssituation in Böden durch Ausbringung von Gülle zu simulieren. Hierzu wurden 10 g der Gülleproben direkt mit der Radiotracer-Lösung (50-100 µL) dotiert und bei  $20 \pm 1$  °C im Dunkeln für 7 Tage inkubiert; exemplarisch wurden auch Lagerungsperioden von 30 und 72 Tagen untersucht. Zur Erprobung dieses neuen Testdesigns wurde die kurzfristige Lagerung gewählt. Denn eine längerfristige bis hin zu 6 Monaten dauernde Güllelagerung, wie sie die Düngeverordnung (1997) vorsieht, konnte für die einzelnen Versuchsreihen im Runoff-Projekt aus Zeitgründen nicht realisiert werden. Während der Inkubation wurde die Freisetzung von  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid quantifiziert. In parallel durchgeführten Ansätzen wurden ferner die Bilanzen aufgestellt und die verbliebene Konzentration der applizierten Ausgangsverbindungen mittels RTLC ermittelt. Aus Praktikabilitätsgründen wurde die Testgülle in den Batchtests zur Untersuchung von Abbau und Sorption in einer Menge appliziert, die die laut Düngeverordnung (1997) zulässige jährliche Höchstmenge um den Faktor 4 überschreitet. Geringere Güllemengen hätten die Handlung bezüglich der Dotiergenauigkeit und der Verluste des Radiotracers durch Adsorption an Glaswandungen beeinträchtigen können (Höltge, 2005).

### 3.1.4 Tests zum Abbau in Boden

#### Mikrobieller und chemischer Abbau im Boden

Die Labortests zur mikrobiellen Abbaubarkeit der Testsubstanzen in Böden wurden in Anlehnung an die BBA-Richtlinie Teil IV, 4-1 (BBA, 1986a) sowie die OECD-Richtlinien 304 und 307 (OECD, 1981a, 2002a) in der in **Abb. 3.2** dargestellten geschlossenen Batchapparatur durchgeführt. Zu 50 g mikrobiell aktivem Boden (TS) wurden 50-100 µL Standardlösung der jeweiligen Radiotracer, entsprechend einer Ausgangsaktivität von 0.05-0.08 MBq bzw. einer Konzentration von 200-2950 µg kg<sup>-1</sup> Boden, hinzugefügt (**Standard-Applikation**; s. Tab. 3.1). In Ergänzung hierzu wurden auch Abbautests nach **Testgülle-Applikation** durchgeführt. Die Inkubation der auf einen Wassergehalt von ca. 40 % der maximalen Wasserhaltekapazität ( $WK_{\text{max}}$ ) eingestellten Ansätze erfolgte bei  $20 \pm 1$  °C im Dunkeln mit Inkubationsintervallen von 0, 1, 3, 7, 14, 28, 56 und

102 Tagen.

Für die Untersuchungen zum chemischen Abbau wurden die Bodenproben an 3 aufeinanderfolgenden Tagen je 2 x 20 min bei  $2.5 \times 10^5$  Pa und 140 °C autoklaviert. Nach SIR-Kontrolle wurden diese mikrobiell inaktiven Bodenproben in den Batchapparaturen allerdings nur für 3-tägige Kurzzeittests eingesetzt, da sich die Inaktivierung unter diesen Inkubationsbedingungen aufgrund später einsetzender Sporulation nicht länger aufrechterhalten lässt.

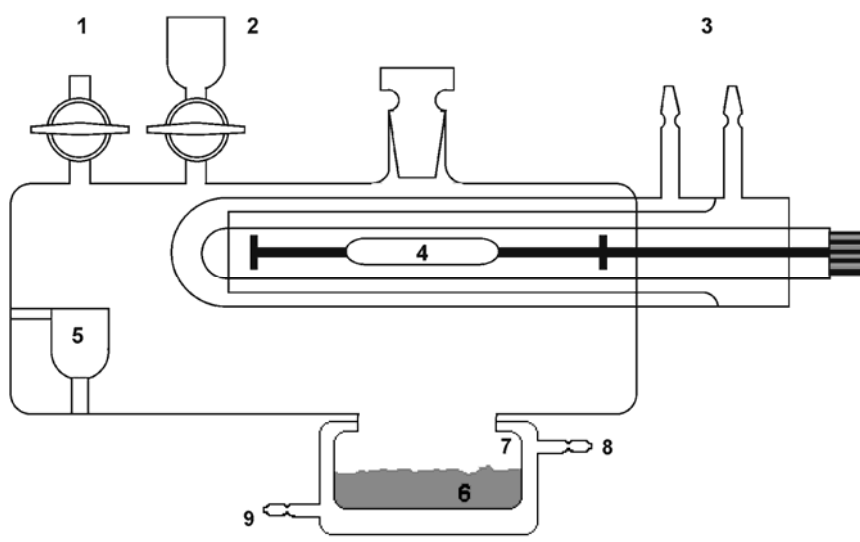
Für die Bilanzierung in diesen Abbauxperimenten galt es, neben der Ermittlung der Mineralisation eine Differenzierung zwischen extrahierbaren und nicht-extrahierbaren Rückständen vorzunehmen. Zur Bestimmung der extrahierbaren Bestandteile wurden die Bodenproben einer Ethylacetat-Extraktion unterzogen (Andersson und Pålsheden, 1991, Koinecke et al., 1994). Auch hier zeigte Ethylacetat mit durchschnittlichen Wiederfindungsraten von 95 % die deutliche höhere Extraktionseffizienz als Methanol (70 %). Die hieraus resultierenden Extraktionsrückstände wurden zusätzlich zur Charakterisierung der Bindungsstärke der nicht-extrahierbaren Rückstände einer Nachextraktion mit salzsaurem Methanol unterzogen. Hierzu wurden die bereits extrahierten Tag-102-Proben (20 g) mit einer Mischung aus 600 µL konzentrierter Salzsäure und 150 mL Methanol bei  $220 \text{ U min}^{-1}$  über Nacht nachbehandelt. Die weiteren analytischen Schritte entsprachen denen der Gülleanalytik. Das gilt auch für die Bestimmung nicht-extrahierbarer Anteile, nur mit dem Unterschied, dass zum Abtrocknen der extrahierten Bodenproben kein Zusatz von Seesand erforderlich war.

### **Photoinduzierter Abbau in Boden**

Die Experimente zum photoinduzierten Abbau der Testsubstanzen in Boden wurden in einer weiterentwickelten Bestrahlungsapparatur (Kreuzig, 1998, Höllrigl-Rosta et al., 1999, Kreuzig et al., 2003) durchgeführt (**Abb. 3.3**). Die Unterschiede des im OECD-Entwurfes zur Phototransformation von Chemikalien auf Bodenoberflächen beschriebenen Versuchsaufbaues (OECD, 2002b) wurden bereits ausführlich im Endbericht zum Boden-Projekt diskutiert (Kreuzig et al., 2005a).

In den Probenbehälter wurden Bodenproben (50 g) eingefüllt, die auf ca. 40 % der  $WK_{\max}$  eingestellt waren. Der Einsatz mikrobiell aktiver und inaktiver Böden führte dabei zur Differenzierung des photoinduziert-mikrobiellen (PMA) und des photoinduziert-chemischen Abbaues (PCA). Die pharmazeutischen Testsubstanzen wurden mittels Standard- bzw. Testgülle-Applikation (0.05-0.08 MBq) in die Bestrahlungsapparatur

eingbracht. Die Inkubation erfolgte bei  $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  mit 10 h-Licht/14 h-Dunkelperioden über 3 Tage. Diese Bestrahlungsexperimente waren ganz gezielt als Kurzzeittests ausgelegt. Weil die Eindringtiefe des Sonnenlichtes in Böden unter Freilandbedingungen auf die oberste Bodenschicht begrenzt ist, werden photoinduzierte Effekte durch Prozesse wie Infiltration und Versickerung schnell minimiert. In den die Gülleausbringung simulierenden Ansätzen ist ferner die Düngeverordnung (1997) zu berücksichtigen, in der eine zur Ausbringung zeitnahe Einarbeitung der Gülle in den Boden von Ackerstandorten vorgeschrieben wird.



**1:** Einlassventil, **2:** Auslassventil mit Aktivkohlefilter, **3:** Wasserkühlung, **4:** Quecksilber-Mitteldruckstrahler mit Pyrex<sup>®</sup>-Kühlmantel (cut off:  $\lambda = 290 \text{ nm}$ ), **5:** <sup>14</sup>C-Kohlendioxid-Falle (8 mL 0.1 M Kaliumhydroxid-Lösung), **6:** Probe, **7:** abnehmbarer Probenbehälter, **8,9:** Wasserkühlung des Probenbehälters

**Abb. 3.3: Bestrahlungsapparatur für Batchexperimente zum photoinduzierten Abbau von <sup>14</sup>C-markierten Chemikalien in Boden**

### 3.1.5 Charakterisierung nicht-extrahierbarer Rückstände in Boden

Bereits aus dem Boden-Projekt sowie aus den ersten Abbautests im Runoff-Projekt war bekannt, dass die Rückstandsdynamik der Sulfonamid-Antibiotika Sulfadiazin und

Sulfamethoxazol insbesondere nach Testklärschlamm- bzw. Testgülle-Applikation durch die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände in Boden bestimmt wird (Kreuzig et al., 2005a, Kreuzig und Höltge, 2005). Deswegen stellte sich in diesem Zusammenhang die Frage, inwieweit diese nicht-extrahierbaren Rückstände chemisch und biologisch charakterisiert werden können.

### **Chemische Charakterisierung**

Unter dem Gesichtspunkt der chemischen Charakterisierung galt es, die Bindungsstärke dieser in der Bodenmatrix festgelegten Rückstände über die extraktive Probenbehandlung mit Ethylacetat und salzsaurem Methanol hinausgehend zu bewerten. Hierzu wurden die aus den Batchtests stammenden Extraktionsrückstände (s. Kap. 3.1.4) in Anlehnung an Klaus et al. (1998) und Berns (2003) einer Derivatisierung mit Chlortrimethylsilan unterzogen. Mit dieser Silylierungstechnik erfolgt eine Umsetzung funktioneller Gruppen der Bodenmatrix, die eine Freisetzung applizierter Testsubstanzen oder während der Inkubation gebildeter Metaboliten ermöglichen kann. Nach dieser Behandlung in der Bodenmatrix verbleibende Rückstände sind dann als kovalent gebundene Rückstände anzusehen. Ferner sollte das Metaboliten-Screening mittels RTLC zur stofflichen Aufklärung der Extraktzusammensetzung beitragen. Die analytisch-chemische Vorgehensweise ist detailliert bei Heise et al. (2006) beschrieben.

### **Biologische Charakterisierung**

Die Festlegung von Veterinärpharmaka in der Bodenmatrix kann einen effektiven Eliminationsprozess für diese Substanzen darstellen, sofern diese nicht durch z.B. Milieuänderungen remobilisiert werden können. Ein Ziel dieser biologischen Charakterisierung war es deswegen, eine solche Milieuänderung durch die Zugabe von Belebtschlamm zu den Extraktionsrückständen zu simulieren (Kreuzig, 1998). Darüber hinaus sollte die Remobilisierung mittels Pflanzen-Test mit *Brassica rapa* (White et al., 2003) und mittels Regenwurm-Test A mit *Lumbricus terrestris* untersucht werden (Gevaeo, et al., 2001). In Ergänzung zu den Remobilisierungstests wurde im Regenwurm-Test B untersucht, inwieweit die Bildung nicht-extrahierbarer <sup>14</sup>C-Sulfamethoxazol-Rückstände nach Standard- und Testgülle-Applikation durch die Aktivität von *Lumbricus terrestris* beeinflusst wird (Immobilisierungstest). Details der Versuchsdurchführung sind bei Heise et al. (2006) beschrieben.

### 3.1.6 Tests zur Mobilität in Boden

#### Bestimmung von Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten

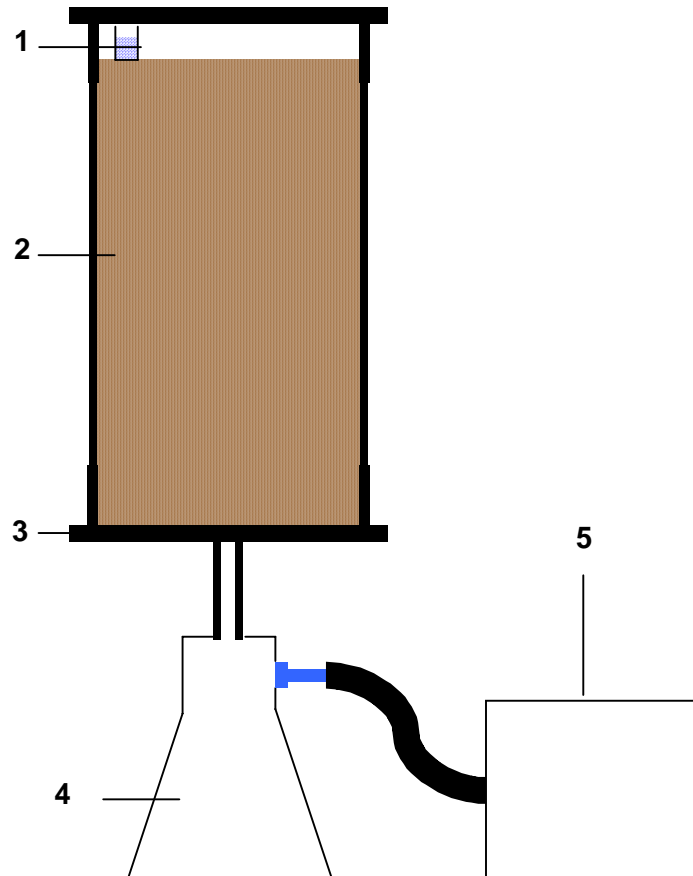
Die Verfügbarkeit einer Chemikalie in der Bodenlösung und in Biofilmen von Bodenpartikeln ist für seine Mobilität und Abbaubarkeit von entscheidender Bedeutung. Zur Ermittlung des Sorptionsverhaltens der Testsubstanzen in den zu untersuchenden Böden wurden deswegen die Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten als  $K_d$ - und  $K_{OC}$ -Werte bestimmt, aus denen erste Tendenzen der Mobilität in Böden abgeleitet werden können. Diese Tests wurden in Anlehnung an die Richtlinie 106 "Adsorption/Desorption" der OECD (1981b, 2000a) durchgeführt. Zur naturnäheren Wiedergabe des Verhältnisses Boden zu Bodenlösung wurde dieses, wie bereits vielfach in der Fachliteratur beschrieben (Boesten, 1990, Rütters et al., 1999, von Oepen et al., 1991), von 1:5 auf 1:1.4 erhöht. Die einzelnen Schritte der Versuchsdurchführung sind detailliert bei Kreuzig et al. (2003) beschrieben.

Mit der Applikation von Testgülle wurde auch hier der Eintragspfad für Veterinärpharmaka in Böden durch die Gülleausbringung betrachtet. So konnten in diesen Batch-Equilibrium-Tests auch die Einflüsse der jeweiligen Güllematrix Berücksichtigung finden, die infolge einer Sorption an die organische Substanz eine Verminderung, aber durch Co-Sorption an wasserlösliche organische Substanzen (DOC) und dem damit möglichen Co-Transport auch eine Erhöhung der Mobilität von Veterinärpharmaka in Böden bewirken kann.

#### Laborlysimetertests

Um über die  $K_d$ - bzw.  $K_{OC}$ -Werte für  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin hinaus erste Erkenntnisse über Verlagerungstendenzen in tiefere Bodenschichten zu erlangen, wurden exemplarisch Laborlysimetertests mit ungestörten Bodenmonolithen (30 cm Höhe, 15 cm innerer Durchmesser) vom Ackerstandort Adenstedt (AD-A) durchgeführt, auf die  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin als Testgülle appliziert wurde. Hierzu wurden 100 g Rindergülle mit  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin-Standardlösung (0.6 MBq) versetzt und 7 Tage bei  $20 \pm 1$  °C im Dunkeln inkubiert. In Anlehnung an die Düngeverordnung (1997) wurde diese Testgülle unmittelbar nach Applikation oberflächennah eingearbeitet. Der Verbleib von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin wurde wiederum in einem geschlossenen Labortestsystem (**Abb. 3.4**) bilanziert. Um eventuelle Unterschiede bei der Verlagerung von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in den in Dreifachbestimmung durchgeführten Experimenten bewerten zu können, die ggf. durch gestörte Fließwege

in den Bodenkernen bedingt waren, wurde zusätzlich Lithiumbromid-Lösung ( $1 \text{ g Bromid L}^{-1}$ ) als konservativer, hydrologischer Tracer appliziert und die Bromid-Konzentrationen bei jeder Perkolatentnahme mittels Ionenchromatographie ermittelt.



1:  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid-Absorptionsfalle (8 mL 0.1 M Kaliumhydroxid-Lösung), 2: Bodenmonolith, 3: Einsatz mit Ablaufrohr, Membran und Seesandfüllung, 4: Perkolatsammler, 5: Membranpumpe

**Abb. 3.4: Laborlysimetersystem zur simultanen Erfassung von Abbau und Verlagerung  $^{14}\text{C}$ -markierter Chemikalien in ungestörten Bodenmonolithen**

Innerhalb von 14 Tagen wurden die Bodensäulen 10 Tage lang diskontinuierlich mit einem Volumen von 176 mL demineralisiertem Wasser beregnet, was einer Beregnungsmenge von  $10 \text{ mm d}^{-1}$  entsprach. Insgesamt wurde damit ein Niederschlag von 100 mm simuliert. Am Ende jedes Beregnungstages wurde Stauwasser, das sich im unteren Bereich der Bodensäule angesammelt hatte, unter leichtem Unterdruck abge-

saugt, das Volumen des Perkolats bestimmt und ein 10 mL-Aliquot in 10 mL Szintillationscocktail Quicksafe A mittels Flüssigszintillationszählung analysiert. Darüber hinaus wurde das Perkolat einem RTLC-Screening unterzogen. Unmittelbar vor der Perkolatentnahme erfolgte der Austausch der Kaliumhydroxid-Lösung zur Bestimmung der Mineralisation. Nach Abschluss der Beregnungsperiode wurden die Bodenmonolithen in 5 cm-Schichten abgetragen und entsprechend den Abbauntersuchungen (Kap. 3.1.4) analysiert.

**Tab. 3.2: Geräteparameter der HPLC/UV-D-Analytik**

	<b>Sulfonamide</b>	<b>Benzimidazole</b>	<b>Ivermectin</b>
HPLC-System	HP 1050 Series Autosampler, UVD	HP 1050 Series Autosampler, UVD	HP 1050 Series Autosampler, UVD
Säule	LiChrocart 250-4 LiChrospher 100, 5 µm	LiChrocart 250-4 LiChrospher 100, 5 µm	ODS Hypersil 250-4 5 µm
Eluent A	H <sub>2</sub> O mit 2 % CH <sub>3</sub> COOH	0.1 M CH <sub>3</sub> COONa/ CH <sub>3</sub> CN (7:3)	CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O (9:1)
Eluent B	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (3:2)	CH <sub>3</sub> CN	---
Gradient	0 min → 15 % B 20 min → 40 % B 25 min → 60 % B 30 min → 15 % B	0 min → 0 % B 2 min → 0 % B 15 min → 50 % B 18 min → 50 % B	---
UVD: λ [nm]	275	260	245
Fluss [mL min <sup>-1</sup> ]	1.5	1.0	1.5

### 3.2 Rückstandsanalytische Methoden

Da das Rückstandsverhalten der zu untersuchenden Testsubstanzen erst in den letzten Jahren in den Blickpunkt wissenschaftlichen Interesses gelangte, lagen zu Beginn des Runoff-Projektes nur wenige analytische Methoden zur Bestimmung von Veterinärpharmaka in Gülle und Boden vor (z.B. Langhammer et al., 1988, Langhammer, 1989, Bartolucci et al., 2000, Haller et al., 2002, Hamscher et al., 2000, 2002, Pfeifer et



al., 2002). Deswegen wurden auf der Basis von analytischen Verfahren zur Untersuchung von tierischen und pflanzlichen Lebensmitteln rückstandsanalytische Methoden für die Bestimmung der Testsubstanzen in Gülle-, Wasser-, Boden- und Sedimentproben entwickelt. Die Einzelheiten der Analysenmethoden werden bei Höltge (2005) beschrieben. An dieser Stelle wird nur ein Überblick über die Analysenmethoden gegeben, die für die Auswertung der Labortests mit Ivermectin, der Labortests zur terrestrischen und aquatischen Ökotoxikologie sowie der Testplot-Experimente Anwendung fanden.

**Tab. 3.3: Geräteparameter der HPLC/MS-Analytik**

	<b>Sulfonamide</b>	<b>Benzimidazole</b>	<b>Benzimidazole</b>
<b>LC-Parameter</b>			
Hersteller	HP 1100 Series	HP 1100 Series	HP 1100 Series
Säule	ODS Hypersil 250-2 5 µm	ODS Hypersil 250-2 5 µm	Luna C18 150-3 3 µm
Eluent A	0.05 M CH <sub>3</sub> COONH <sub>3</sub> , 0.05 % CH <sub>3</sub> COOH	0.05 M CH <sub>3</sub> COONH <sub>3</sub> , 0.05 % CH <sub>3</sub> COOH	H <sub>2</sub> O mit 0.1 % HCOOH
Eluent B	CH <sub>3</sub> CN	CH <sub>3</sub> CN	CH <sub>3</sub> CN mit 0.1 % HCOOH
Gradient	0 min → 20 % B 5 min → 20 % B 15 min → 40 % B 20 min → 20 % B	0 min → 50 % B 5 min → 70 % B 10 min → 50 % B	0 min → 30 % B 8 min → 70 % B 10 min → 100 % B 11 min → 30 % B 18 min → 30 % B
Fluss [mL min <sup>-1</sup> ]	0.3	0.3	0.3
<b>MS-Parameter</b>			
Hersteller	Bruker Daltonics	Bruker Daltonics	Applied Biosystems
Typ	Esquire-LC	Esquire-LC	API 3000
Modus	ESI, positiv	ESI, positiv	ESI, positiv
m z <sup>-1</sup>	SDZ: 251 SDM: 279 SMZ: 254	FLU: 282 FEN: 268	FLU: 282 FEN: 268 OX-FEN: 191

Die Identifizierung und Quantifizierung der Testsubstanzen erfolgte jeweils mittels RP-HPLC/UVD-Analytik (**Tab. 3.2**). Zur Ergebnisabsicherung für die Sulfonamide und die Benzimidazole wurden ausgewählte Proben zusätzlich mittels HPLC/ESI-MS analysiert (Balisz, 1999, Balisz et al., 1994) (**Tab. 3.3**). Zur Ergebnisbestätigung wurde Ivermectin mittels 1-Methylimidazol und Trifluoressigsäureanhydrid derivatisiert und mittels RP-HPLC/FLD ( $\lambda_{EX}$ : 364 nm,  $\lambda_{EM}$ : 480 nm) gemessen.

### 3.2.1 Gülleanalytik

Gülle ist eine heterogene Probenmatrix hoher Komplexität, deren Zusammensetzung aufgrund ihrer mikrobiellen Aktivität einer ständigen Veränderung unterliegt. Ferner spielen die Einflüsse der Tierarten, Fütterungsbedingungen, Einleitungen von Desinfektions- und Reinigungsmitteln sowie Lagerungsbedingungen eine entscheidende Rolle. Deswegen war es für die zu untersuchenden Gülleproben nicht möglich, bereits in der Literatur beschriebene Analysenverfahren ohne Modifikationen zu übernehmen.

**Tab. 3.4: Mittlere Wiederfindungsraten und Standardabweichungen aus Zusatzversuchen für Veterinärpharmaka in Gülleproben<sup>#</sup>**

Konz. [ $\mu\text{g kg}^{-1}$ ]	Sulfonamide				Benzimidazole			Ivermectin	
	n	SDZ [%]	SDM [%]	SMZ [%]	n	FLU [%]	FEN [%]	n	IVE [%]
20000	3	78 ± 17	97 ± 11	86 ± 11	3	99 ± 7	85 ± 6	3	89 ± 13
10000	3	84 ± 1	91 ± 5	75 ± 3	3	101 ± 3	86 ± 8	3	78 ± 13
1000	4	96 ± 12	83 ± 16	89 ± 12	4	73 ± 10	79 ± 5	4	98 ± 11
500	8	108 ± 15	89 ± 14	98 ± 11	8	80 ± 14	75 ± 10	6	75 ± 18
250	8	93 ± 13	97 ± 10	67 ± 15	5	82 ± 5	94 ± 6	4	87 ± 16
100	6	68 ± 15	67 ± 20	71 ± 18	5	108 ± 10	90 ± 14	3	61 ± 12

<sup>#</sup>: **Rindergülle:** Sulfonamide, Ivermectin; **Schweinegülle:** Benzimidazole

Die amphoteren Sulfonamide wurden aus den Gülleproben mittels Schüttelextraktion unter Verwendung eines Gemisches aus Natriumacetatpuffer und Ethylacetat freige-

setzt. Die aufkonzentrierten Extrakte wurden in 2 Schritten mittels Festphasenextraktion gereinigt. Im ersten Schritt wurden die Analyten mittels Aminopropyl-Kartuschen angereichert und mittels Reinstwasser desorbiert. Im zweiten Schritt wurden Polystyrol-Divinylbenzol-Kartuschen und ein Acetonitril/Methanol-Gemisch (1:1) eingesetzt. Die aufkonzentrierten Eluate wurden anschließend in Acetonitril/Wasser (1:9) aufgenommen. Die Benzimidazole wurden mit demselben Verfahren extrahiert, dann aber mittels C<sub>18</sub>polarplus-Festphasenkartuschen angereichert und mit dem Acetonitril/Methanol-Gemisch (1:1) desorbiert. Nach Umlösen in Methanol folgte ein zweiter Reinigungsschritt mittels Gelpermeationschromatographie an Sephadex LH-20. Das Laufmittel war essigsäures Methanol. Die Analysenlösung wurde aufkonzentriert und in Acetonitril/Wasser (1:1) umgelöst. Ivermectin wurde mittels eines Gemisches aus Acetonitril/Wasser/Cyclohexan (1:1:5) extrahiert. Der Extrakt wurde in 2 Schritten mittels Aminopropyl- und Silicagel-Kartuschen gereinigt. Desorptionsmittel waren ein Dichlormethan/Aceton-Gemisch (1:1) bzw. ein Hexan/Ethylacetat-Gemisch (1:1). Die Analysenlösung wurde in ein Methanol/Wasser-Gemisch (9:1) umgelöst und aufkonzentriert und mittels HPLC analysiert. Die in Zusatzversuchen erzielte Qualität dieser analytischen Methoden ist in **Tab. 3.4** ausgewiesen. Die Bestimmungsgrenzen für die einzelnen Analyten waren 100 µg kg<sup>-1</sup> Gülle.

### 3.2.2 Wasseranalytik

Wässrige Proben fielen aus den Labortests zur Ermittlung von Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten von Ivermectin, aus den ökotoxikologischen Labortests sowie aus den Testplot-Experimenten zur Ermittlung der Runoff-Austräge an. Die hierfür erforderlichen Analysenmethoden wurden deswegen unter Verwendung von Oberflächenwasserproben entwickelt. Aufgrund der gegenüber den Gülleproben geringeren Komplexität der Wasserproben, aus denen Feststoffe mittels Zentrifugation abgetrennt wurden, erfolgte für die einzelnen Analyten eine einstufige Festphasenextraktion. Für die Sulfonamide wurde so die Polystyrol-Divinylbenzol-Kartusche und für die Benzimidazole die Cyano-Kartusche verwendet. Elutionsmittel waren ein Acetonitril/Methanol-Gemisch (1:1) bzw. Methanol mit Triethylamin-Zusatz (0.2 %). Für Ivermectin dagegen erfolgte die Analyt-Anreicherung aus der wässrigen Phase in einem Flüssig/Flüssig-Verteilungsschritt mittels Cyclohexan. Dieser Extrakt wurde unter Verwendung einer

Aminopropyl-Kartusche mit anschließender Elution mit einem Dichlormethan/Aceton-Gemisch (1:1) gereinigt und mittels HPLC analysiert. Die für die einzelnen Konzentrationsstufen der Zusatzversuche erzielte Qualität ist in **Tab. 3.5** ausgewiesen. Die Bestimmungsgrenzen für die Analyten waren  $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$  Oberflächenwasser.

**Tab. 3.5: Mittlere Wiederfindungsraten und Standardabweichungen aus Zusatzversuchen für Veterinärpharmaka in Wasserproben**

Konz. [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Sulfonamide				Benzimidazole			Ivermectin	
	n	SDZ [%]	SDM [%]	SMZ [%]	n	FLU [%]	FEN [%]	n	IVE [%]
50	4	71 ± 11	70 ± 5	71 ± 5	--	--	--	--	--
25	10	87 ± 4	88 ± 5	76 ± 4	12	85 ± 5	79 ± 7	12	75 ± 10
10	10	76 ± 7	78 ± 8	88 ± 5	12	75 ± 7	84 ± 3	12	89 ± 13
5	10	83 ± 5	78 ± 5	92 ± 6	12	88 ± 7	83 ± 4	12	88 ± 12
2	10	85 ± 6	85 ± 6	95 ± 10	12	85 ± 6	81 ± 7	12	83 ± 12
1	10	82 ± 6	84 ± 13	89 ± 12	15	87 ± 10	93 ± 5	12	75 ± 11
0.5	10	79 ± 9	80 ± 12	76 ± 13	13	78 ± 3	84 ± 7	12	76 ± 13
0.2	15	103 ± 10	87 ± 13	86 ± 15	15	74 ± 5	87 ± 8	15	89 ± 10

--: nicht untersucht

### 3.2.3 Boden- und Sedimentanalytik

Da aus den Testplot-Experimenten Boden- und Sedimentproben mit höheren Wassergehalten als aus den Laborbatchtests anfielen, war hier ein Extraktionsmittel auszuwählen, das eine ausreichende Benetzung der Probenmatrix und damit eine ausreichende Extraktionseffizienz gewährleistete. In Anlehnung an Pfeifer et al. (2002) wurde so ein Gemisch aus Natriumacetatpuffer und Ethylacetat eingesetzt, mit dem sowohl die Sulfonamide als auch die Benzimidazole aus den beiden Probenmatrizes extrahiert werden konnten. Die Extraktreinigung erfolgte in beiden Fällen mittels Gelpermeationschromatographie unter Verwendung von Sephadex LH-20 und essigsauerm Methanol als Laufmittel. Für Ivermectin erfolgte die Aufarbeitung der Proben in Anlehnung an die Gülleanalytik. Als Extraktionsmittel wurde wieder das Gemisch aus Acetoni-

tril/Wasser/Cyclohexan (1:1:5) eingesetzt. Die Extraktreinigung wurde mittels Amino-propyl-Festphasenkartuschen durchgeführt. Nur die Extrakte der Bodenproben aus den Abbautests nach Testgülle-Applikation erforderten einen zusätzlichen Reinigungsschritt mit Silicagel-Kartuschen. Die HPLC-Analysen erfolgten wie bereits beschrieben. Bei den in **Tab. 3.6** aufgeführten Qualitätskriterien konnten für die untersuchten Testsubstanzen Bestimmungsgrenzen von 20 µg kg<sup>-1</sup> trockenen Boden erzielt werden.

**Tab. 3.6: Mittlere Wiederfindungsraten und Standardabweichungen aus Zusatzversuchen für Veterinärpharmaka in Bodenproben**

Konz. [µg kg <sup>-1</sup> ]	Sulfonamide				Benzimidazole			Ivermectin	
	n	SDZ [%]	SDM [%]	SMZ [%]	n	FLU [%]	FEN [%]	n	IVE [%]
2000	5	73 ± 20	108 ± 14	93 ± 10	--	--	--	--	--
1000	2	80 ± 17	85 ± 9	92 ± 2	3	--	80 ± 10	5	79 ± 12
500	8	66 ± 17	72 ± 31	85 ± 21	7	102 ± 5	84 ± 8	13	77 ± 11
200	14	63 ± 16	62 ± 15	79 ± 15	7	81 ± 13	95 ± 8	11	81 ± 20
100	12	60 ± 13	61 ± 11	83 ± 10	10	108 ± 7	83 ± 10	8	101 ± 18
40	13	63 ± 10	76 ± 21	70 ± 10	13	84 ± 5	70 ± 11	6	86 ± 8
20	12	85 ± 15	81 ± 14	85 ± 11	15	74 ± 12	94 ± 12	6	87 ± 15

--: nicht untersucht

### 3.3 Labortests zur Ökotoxikologie ausgewählter Veterinärpharmaka

Mit der Ausbringung von Gülle aus der Intensivtierhaltung können Veterinärpharmaka direkt in den Boden und von hier nach Starkregenereignissen durch Oberflächenabfluss in Fließgewässer eingetragen werden. Neben den Untersuchungen zum Rückstandsverhalten in Böden und der Quantifizierung von Runoff-Austrägen ist damit auch die ökotoxikologische Wirkung dieser Substanzen in terrestrischen und aquatischen Systemen von Interesse.

### 3.3.1 Terrestrische Testsysteme

Da die Bioverfügbarkeit von Rückständen im Boden nicht ausschließlich von der in der Wasserphase gelösten Menge der Stoffe abhängt (Rönnpapel et al., 1996, 1998, Cuno, 1996, Vanhala und Athianinen, 1994, Fretwurst und Ahlf, 1996), wurden Wirkungstests ausgewählt, bei denen nicht nur wässrige Lösungen (Eluate), sondern der Boden direkt untersucht werden konnte. In Ergänzung zur substratinduzierten Respiration als Maß für die mikrobielle Bodenaktivität (BBA, 1990) wurden so mit der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität der mikrobiellen Bodenbiozönose (Malkomes, 1991) sowie dem Kontakttest mit dem Bodenbakterium *Arthrobacter globiformis* (Gunkel et al., 1993, Rönnpapel et al., 1998, DIN, 2002) 2 Tests zur Überprüfung der Lebensraumfunktion von Böden eingesetzt. Darüber hinaus wurde die Lumineszenz-Hemmung von *Vibrio fischeri* (Farreé und Barceló, 2003) zur Untersuchung des ökotoxikologischen Potentials der Veterinärpharmaka bestimmt. Diese Wirkungstests wurden jeweils bei Konzentrationen der Testsubstanzen von 10 bzw. 100 mg kg<sup>-1</sup> Boden durchgeführt. Im Detail ist das experimentelle Design bei Kolb et al. (2006) beschrieben.

#### **Substratinduzierte Respiration**

Die mikrobielle Bodenaktivität stellt eine Voraussetzung für die Abbaubarkeit von Chemikalien in Gülle und Böden dar. Deswegen wurde diese für die in den Abbautests eingesetzten Bodenproben grundsätzlich mittels substratinduzierter Respiration (SIR) nach der Sapromat-Methode überprüft (BBA, 1990). Da die Testsubstanzen bei der Standard-Applikation mittels eines geeigneten Lösungsmittels in die Labortestsysteme eingebracht wurden, galt es auch, dessen Wirkung auf die Bodenmikroorganismen festzustellen (Höltge, 2005). Außerdem wurde der Erfolg der Deaktivierung von Bodenproben durch Autoklavieren kontrolliert. Schließlich wurde in den Testplot-Experimenten der Einfluss der mit Testgülle in den Boden eingebrachten Veterinärpharmaka zur weiteren Charakterisierung der jeweiligen Rückstandssituation untersucht.

#### **Dehydrogenaseaktivität**

Mit der Dehydrogenaseaktivität wurde der Einfluss der ausgewählten Testsubstanzen auf die Stoffwechselaktivitäten bodeninhärenter Mikroorganismen gemessen. Durch die Dehydrogenasen intakter Bodenmikroorganismen kommt es zur Reduktion des farblosen wasserlöslichen Triphenyltetrazoliumchlorids (TTC) in rotgefärbtes, wasser-

unlösliches Triphenylformazan (TPF), dessen Konzentration nach Extraktion mit Aceton photometrisch bestimmt und als Maß für die entsprechende Enzymaktivität herangezogen werden kann. Die Durchführung des Tests erfolgte in Anlehnung an das entsprechende DIN-Verfahren (1998).

### **Bodenkontakttest mit *Arthrobacter globiformis***

Der eingesetzte Organismus der Gattung *Arthrobacter* bildet eine zahlenmäßig dominierende Fraktion der aeroben chemoheterotrophen Bakterien im Boden und stellt somit einen typischen Vertreter der Bodenmikroflora dar. Durch den direkten Kontakt der Organismen mit Bodenpartikeln wird die ökotoxikologische Wirkung feststoffgebundener Kontaminationen erfasst (Dott et al., 2001). Rönnpagel (1999) fand im Kontakttest für mit Kupfer und Benzalkoniumchlorid kontaminierte Böden eine größere Empfindlichkeit als in der Untersuchung von Bodeneluaten. In diesem inzwischen standardisierten Kontakttest (DIN, 2002) wird nach Inkubation der Bodenproben mit einer Suspension von *Arthrobacter globiformis* die Dehydrogenaseaktivität im Vergleich zu einem Kontrollansatz bestimmt. Dabei wird als Substrat zugesetztes blaues Resazurin durch intakte bakterielle Dehydrogenasen zu rosafarbenem Resorufin reduziert und die Extinktion des nicht umgesetzten Reazurins bei  $\lambda = 600 \text{ nm}$  gegen Wasser gemessen.

### **Leuchtbakterientest**

Die Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission des marinen Bakteriums *Vibrio fischeri* zur Einschätzung ihrer akuten Toxizität ist eine weit verbreitete standardisierte Methode (EN ISO, 1998). Im Vergleich zu vielen anderen ökotoxikologischen Tests hat der Leuchtbakterientest den Vorteil, dass er bei relativ großer Empfindlichkeit schnell und reproduzierbar durchführbar ist. Das genormte Verfahren, bei dem die Abnahme der Lichtemission nach 30 min Inkubation mit Leuchtbakterien in einem Luminometer gemessen wird, ist jedoch nur für klare wässrige Lösungen bzw. Eluate anwendbar. Um die Leuchtbakterientoxizität direkt in Sediment- und Bodenproben zu prüfen, wurde hier deswegen der als Kontakttests entwickelte "Microtox<sup>®</sup> Solid-Phase-Test" angewendet (Dorn et al., 1998, Guzella, 1998).

Da die Wasserlöslichkeiten der Testsubstanzen nur sehr gering sind, wurden die Benzimidazole und Sulfonamide in Dimethylsulfoxid und Ivermectin in Methanol gelöst (Urstandards:  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) und Reinstwasser (Seralpur<sup>®</sup>) mit diesen Urstandards dotiert. Von diesen wässrigen Lösungen wurden für Screening-Untersuchungen der Leucht-

bakterienhemmung Verdünnungsreihen (1:10) mit Reinstwasser hergestellt. Zur Kontrolle des jeweiligen Lösungsmiteleinflusses wurde eine Verdünnungsreihe mit Lösungsmittel gemessen.

### **3.3.2 Aquatische Testsysteme**

Neben Pflanzenschutzmitteln bilden Veterinärpharmaka eine weitere Klasse an Substanzen landwirtschaftlichen Ursprungs, die potentiell eine toxische Wirkung auf aquatische Lebensgemeinschaften ausüben können. Im Gegensatz zu den gezielt in Agrarökosystemen applizierten Pflanzenschutzmitteln ist jedoch bisher das Gefährdungspotenzial durch Veterinärpharmaka für die aquatische Fauna weitestgehend unbekannt. Lediglich zur akuten Toxizität für *Daphnia magna* liegen einige Ergebnisse vor. Nach Wogram und Liess (2001) lassen sich diese Ergebnisse allerdings nicht uneingeschränkt auf andere Taxa übertragen, da diese gegenüber organischen Toxinen deutlich unterschiedliche Sensitivitäten zeigen können. Für eine ökotoxikologische Folgenabschätzung des Eintrages von Veterinärpharmaka in Oberflächengewässer waren deswegen Untersuchungen unter Einbeziehung weiterer Taxa erforderlich. Ziel dieser ökotoxikologischen Tests war es daher, die toxische Wirkung der als Testsubstanzen in diesem Forschungsvorhaben ausgewählten Veterinärpharmaka auf Makroinvertebraten-Arten aus unterschiedlichen taxonomischen Gruppen in Laborexperimenten zu untersuchen (Hahn et al., 2006).

#### **Auswahl der Testorganismen**

Die Auswahl der Testorganismen orientierte sich daran, ein möglichst breites Spektrum innerhalb der Invertebraten abzudecken. Als Vertreter der verschiedenen systematischen Gruppen sollten solche Arten bevorzugt werden, die als typisch für die Invertebratenfauna kleiner Agrargewässer angesehen werden können und somit einen Ausschnitt der potentiell durch Oberflächenabfluss exponierten Fauna darstellen. Als Testorganismen wurden *Dugesia gonocephala* (Plathelminthes, Turbellaria), *Caenorhabditis elegans* (Nemathelminthes, Nematoda), *Branchionus calyciflorus* (Nemathelminthes, Rotifera), *Tubifex tubifex* (Annelida, Oligochaeta), *Radix ovata* (Gastropoda, Pulmonata), *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera), *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda), *Asellus aquaticus* (Crustacea, Isopoda) und *Amphinemura sulcicollis* (Insecta,



Plecoptera) ausgewählt. Die genannten Arten repräsentieren sechs Invertebratenklassen. Exemplare von *D. gonocephala*, *R. ovata*, *G. pulex*, *A. aquaticus* und *A. sulcicollis* wurden für die Untersuchungen in nicht bis gering belasteten Gewässern im Braunschweiger Umland von Hand gesammelt. *T. tubifex*, *D. magna* und *C. elegans* entstammten Laborzuchten. Der *B. calyciflorus* Test wurde als kommerziell erhältliches Testsystem (ROTOXKIT F®) von Microbiotests Inc. bezogen.

### **Testdesign**

Die Untersuchungen zur Akuttoxizität der Veterinärpharmaka wurden als statische Tests in Anlehnung an das OECD-Standardprotokoll für den akuten Daphnientest durchgeführt (OECD, 2000b). Für den Test mit *B. calyciflorus* existiert ein eigenes Standardprotokoll (ASTM, 1998), welches in diesem Fall verwendet wurde. Abweichend vom genannten Standardverfahren wurde lediglich die Testdauer auf 96 Stunden verlängert. Die Wahl der Testdauer richtete sich hier nach der Zeit, zu der die Kontrollen und ggf. Lösemittelkontrollen noch eine Überlebensrate von mindestens 90 % aufwiesen.

In allen endgültigen Tests wurden die Substanz-Konzentrationen in einer geometrischen Reihe mit dem Faktor 2 eingesetzt. Die Bereiche der effektiven Konzentrationen wurden in Vortests festgestellt. Die Sulfonamide erwiesen sich als hinreichend wasserlöslich (SDM maximal  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , SDZ maximal  $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), so dass auf die Verwendung eines Lösevermittlers verzichtet werden konnte. Die Benzimidazole und Ivermectin wurden hingegen zunächst in Dimethylsulfoxid gelöst und dann in das wässrige Testmedium pipettiert. Die Lösemittelkonzentration betrug dabei 0.01 %, wodurch sich für Fenbendazol und Flubendazol maximale Testkonzentrationen von  $1 \text{ mg L}^{-1}$  und für Ivermectin von  $10 \text{ mg L}^{-1}$  ergaben. Bei diesen Tests wurde eine zusätzliche Lösemittelkontrolle mit Dimethylsulfoxid angesetzt.

Als Testmedien wurde bei den im Freiland gesammelten Arten eine Mischung aus gleichen Teilen Leitungswasser und Wasser aus dem Heimatgewässer der Tiere verwendet (reines Freilandwasser im Falle von *A. sulcicollis*). Die endgültigen Tests wurden bei  $13 \text{ °C}$  und einem 12:12 Hell:Dunkel-Rhythmus (H:D) durchgeführt. *D. magna* wurde bei  $20 \text{ °C}$  und 12:12 H:D in Elendt-M7-Medium (OECD, 2000b) getestet. Von den Nematoden der Art *C. elegans* wurde nach Standardprotokoll (Brenner, 1974) eine synchrone Kultur von Larven angelegt. Im vierten Larvenstadium (bei  $15 \text{ °C}$  nach 4 Tagen) wurden die Tiere für die Untersuchungen verwendet. Tests fanden in modifiziertem

K-Medium (Traunspurger et al., 1997) bei 20 °C und 12:12 H:D statt. Der *B. calicyflorus*-Test wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, die sich nach den Vorschriften der ASTM (1998) richten (25 °C, in Dunkelheit). Die Oligochaeten *T. tubifex* wurden bei 20 °C und 12:12 H:D in Testmedium nach ISO 6341-1982 (OECD, 2000b) exponiert.

In Übereinstimmung mit den Vorschriften für den akuten Daphnientest nach OECD (2000b) wurde als Testendpunkt die Immobilität gewählt und keine Unterscheidung zwischen toten und gelähmten Tieren mit geringen unkoordinierten Bewegungen getroffen.

### **Chemische Analytik**

Von allen endgültigen Tests wurde zu Beginn aus den höchsten Testkonzentrationen eine Probe entnommen und die Substanzkonzentrationen rückstandsanalytisch (s. Kap. 3.2.2) bestimmt. Für diesen Zweck wurden teilweise zusätzliche Proben angesetzt. Die Ivermectin-Konzentration wurde nur im Test mit *A. aquaticus* analysiert, da die Analysemethode zu Beginn der Untersuchungen noch nicht verfügbar war. Weiterhin wurden in jedem Test die Wasserparameter Gesamthärte,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{O}_2$ -Gehalt, Leitfähigkeit und pH-Wert gemessen.

Die Rückstandsanalytik ermittelte für alle untersuchten Testsubstanzen Werte im Bereich  $\pm 20\%$  der Nominalwerte. Damit lagen die Testkonzentrationen im Bereich der in OECD (2000b) geforderten Genauigkeit, was die Verwendung der Nominalkonzentrationen für die Berechnungen von  $\text{EC}_{50}$ - und NOEC-Werten erlaubt.

Die Wasserparameter wurden zu Versuchsbeginn und, falls der Versuch so lange dauerte, nach 96 Stunden bestimmt. In diesem Fall lagen die Werte üblicherweise im Bereich der initialen Werte. Ausnahmen hiervon stellten die Experimente mit den Sulfoamiden und *R. ovata* und *T. tubifex* als Testspezies dar. Hier waren die Nitrit- und Nitrat-Werte erheblich erhöht. Alle Ergebnisse sind in **Tab. 3.7** zusammengestellt.

### **Statistische Auswertung**

Je nach Beschaffenheit der Daten wurde die Mittlere-Effektive-Konzentration ( $\text{EC}_{50}$ ) der Wirkstoffe nach logarithmischer Transformation der Konzentrationswerte mittels Probit-Analyse oder anhand der nicht-parametrischen Spearman-Kärber-Methode berechnet (US-EPA, 2000). Die höchste Konzentration, in der noch kein Effekt nachweisbar war (= No-Observed-Effect-Concentration, NOEC), wurde nach *arcus-sinus*-Trans-

formation der Daten mittels Varianzanalyse, gefolgt von Dunnett's Test als *post-hoc*-Verfahren, errechnet. Wenn aufgrund der Datenstruktur die Voraussetzungen für eine Varianzanalyse, wie z.B. fehlende Normalverteilung und Varianzhomogenität, nicht gegeben war, wurde Steel's-Many-One-Rank-Test bei gleichen Probenumfängen und Wilcoxon's Rank-Sum-Test bei ungleichen Probenumfängen verwendet. In den Fällen, in denen Tiere in Einzelhaltung den Testsubstanzen ausgesetzt wurden, wurde die NOEC-Berechnung mittels Fisher's Exact-Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede wurden bei einem  $P$ -Wert  $\leq 0.05$  erwartet. Alle Berechnungen wurden mit dem Programm ToxStat v3.5 vorgenommen. In einigen wenigen Experimenten zeigte sich bei einer Konzentration kein Effekt, während bei der nächst höheren bereits ein 100 %-Effekt auftrat. In diesem Fall wurde der  $EC_{50}$ -Wert als der arithmetische Mittelwert der beiden Konzentrationen angenommen.

Tab. 3.7: Wasserparameter der Testmedien

	<i>D. gonocephala</i> <sup>a</sup>	<i>C. elegans</i> <sup>b</sup>	<i>B. calyciflorus</i> <sup>b</sup>	<i>T. tubifex</i> <sup>a</sup>	<i>R. ovata</i> <sup>a</sup>	<i>D. magna</i> <sup>b</sup>	<i>G. pulex</i> <sup>a</sup>	<i>A. aquaticus</i> <sup>a</sup>	<i>A. sulci-collis</i> <sup>a</sup>
pH	7.4-7.5	6.5	7.5	7.4-7.9	7.1-7.8	8.0	7.9-8.2	7.5-7.6	6.7-7.2
Leitfähigkeit [ $\mu\text{S cm}^{-1}$ ]	836-926	9900	281	787-1224	736-854	-	736-854	195-265	147-236
O <sub>2</sub> [mg L <sup>-1</sup> ]	7.8-6.4	-	-	-	0.7-4.1	8.0	6.9-7.6	9.0-13.0	8.3-10.2
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mg L <sup>-1</sup> ]	1.0-5.0 <sup>c</sup>	< 0.01	< 0.01	1.0-4.5 <sup>d</sup>	1.0-40.0 <sup>e</sup>	1.0	2.0-20.0	4.0-20.0	2.4-5.0
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> [mg L <sup>-1</sup> ]	0.01-0.2	< 0.001	< 0.001	0.05-0.3	0.01-0.1 <sup>e</sup>	0.005	0.03-0.1	0.02-0.36	0.02-0.38
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> [mg L <sup>-1</sup> ]	0.04-0.16	0.1	< 0.01	0.05-1.6	0.02-0.5	0.1	0.02-0.4	0.03-0.4	0.05-0.06
CaCO <sub>3</sub> [mg L <sup>-1</sup> ]	427-480	< 20	80	329-454	392-462	299	320-451	62-125	213

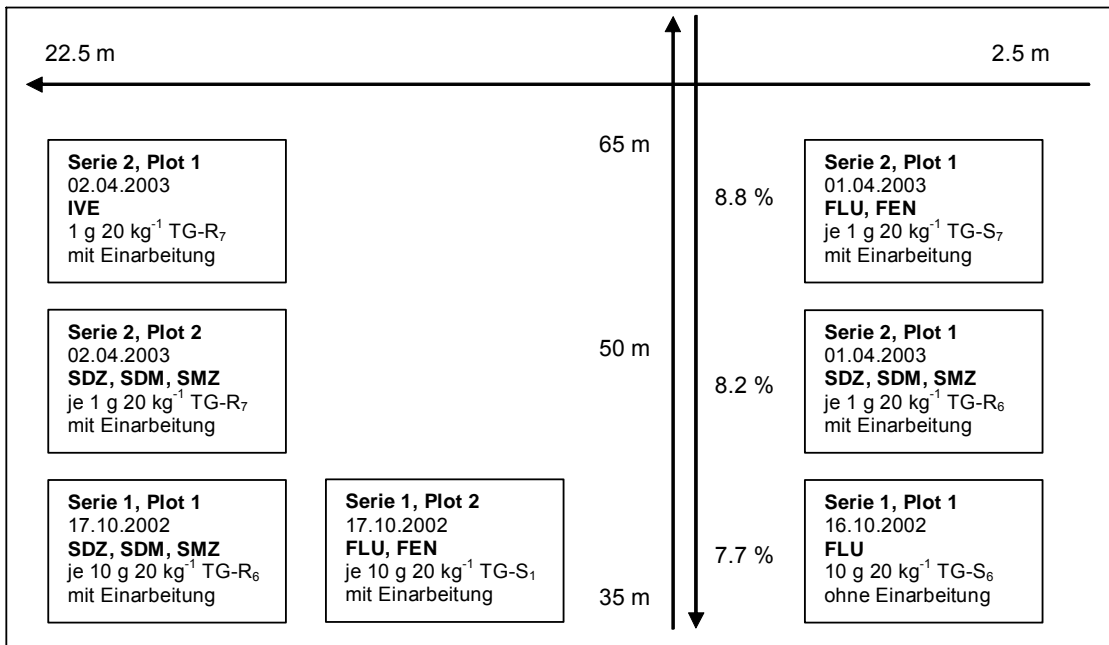
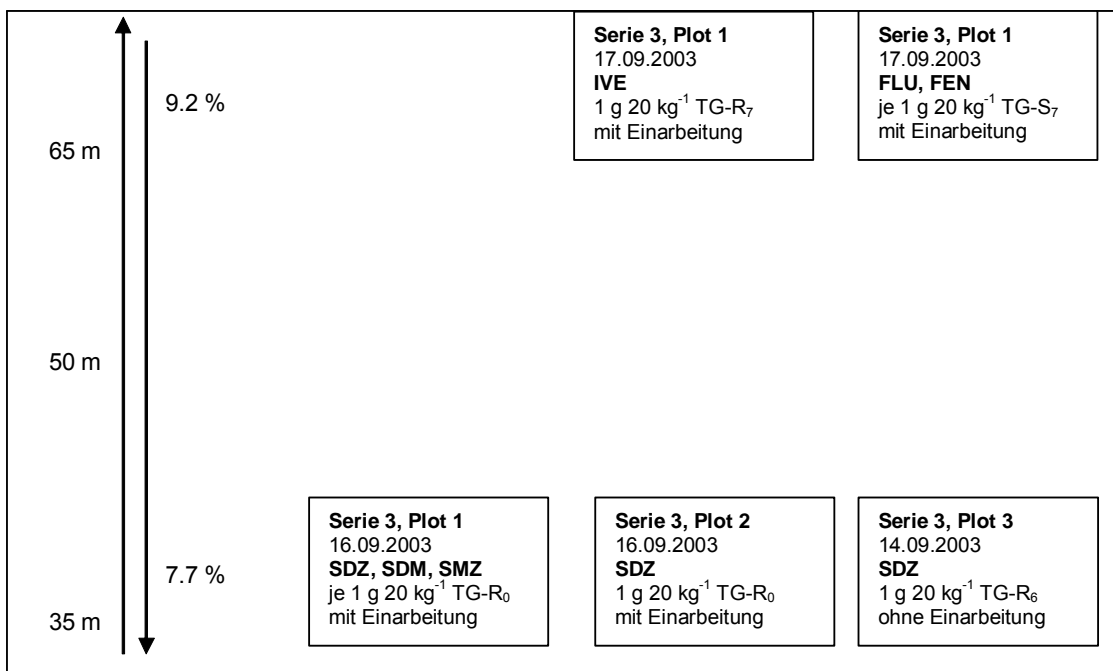
<sup>a</sup>: 96-h Werte. <sup>b</sup>: initiale Werte. <sup>c</sup>: höhere Werte in den Sulfonamid-Proben: NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 15-18 mg L<sup>-1</sup>. NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = 1-2 mg L<sup>-1</sup>. <sup>d</sup>: höhere Werte in den Sulfonamid-Proben: NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 24 mg L<sup>-1</sup>. <sup>e</sup>: höhere Werte in den Sulfonamid Proben: NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 70-100 mg L<sup>-1</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = 3-4 mg L<sup>-1</sup>

### 3.4 Testplot-Experimente

Zu Beginn des Runoff-Projektes lagen zum Abflussverhalten der ausgewählten Veterinärpharmaka von güllegedüngten Böden keine Erkenntnisse vor. Um diese in 3 Testplot-Serien im Oktober 2002 (Serie 1), April 2003 (Serie 2) und September 2003 (Serie 3) zu erarbeiten, wurden Versuchsbedingungen gewählt, die sicher zu einer Abschätzung der Runoff-bedingten Austragssituation sowie der Rückstandssituation im Boden unter Einbeziehung verschiedener Einflussgrößen, wie z.B. standort- und seasonspezifische Unterschiede, führten. Zu diesen Bedingungen zählte die Intensivberegnung mit  $50 \text{ mm h}^{-1}$  für 2 h, die eine Ermittlung der potentiellen und der zeitaufgelösten, aktuellen Runoff-Austräge ermöglichen sollte. Insbesondere für den letzteren Aspekt, der die Entnahme von Runoff-Proben in 5-10 min-Intervallen vorsah, wurden die Veterinärpharmaka in deutlich höheren Konzentrationen in die Testgülle dotiert, als sie aus Einträgen aus der Intensivtierhaltung in Gülle zu erwarten sind (Höltge, 2005, Kreuzig et al., 2005b). So betragen die Dotierkonzentrationen der Testsubstanzen  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  Gülle in Serie 1 und  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  Gülle in den Serien 2 und 3. Im Vergleich hierzu wurden in verschiedenen Schweinegülleproben Sulfadiazin und Sulfadimidin in Konzentrationen von 49 bzw.  $7 \text{ mg kg}^{-1}$  gefunden (Winckler et al., 2004), während Montforts (2001) für Ivermectin die höchste in Rindergülle nachgewiesene Konzentration mit  $9 \text{ mg kg}^{-1}$  Gülle bezeichnete. Nach einer auf Spaepen et al. (1997) zurückgehenden Methode zur Abschätzung der Konzentrationen ("predicted environmental concentration"; PEC) von Veterinärpharmaka in Gülle und Boden, die auch im Rahmen international gültiger Richtlinien für die Umweltrisikoprüfung verankert ist (VICH, 2000), ist z.B. für Fenbendazol mit Konzentrationen in Schweinegülle von ca.  $0.5 \text{ mg kg}^{-1}$  zu rechnen (Scheef, 2005).

#### 3.4.1 Einrichten der Testplots

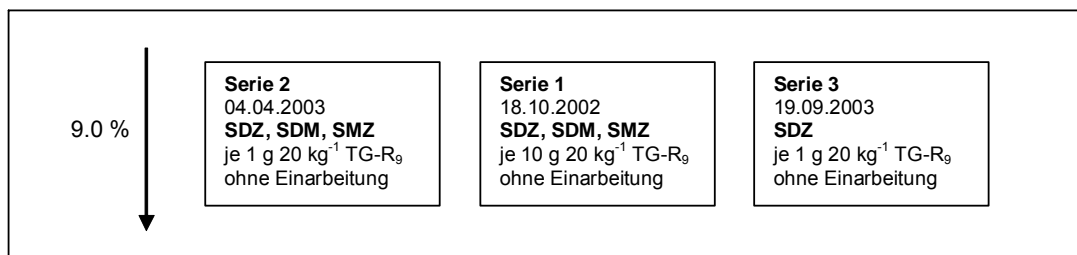
Für diese Freilandstudien wurden auf einer Acker- und einer Grünlandfläche im Untersuchungsgebiet Adenstedt Testplots von  $4 \times 2 \text{ m}^2$  eingerichtet. Hierzu wurden Leitbleche, eine Abflusssrinne und ein Runoff-Sammler im Boden jedes Testplots installiert, um den Oberflächenabfluss nach den simulierten Starkregenereignissen quantitativ aufzufangen (s. Kap. 3.4.3, Abb. 3.7).

**A****B**

TG-R<sub>x</sub>: Testgülle (Rindergülle), TG-S<sub>x</sub>: Testgülle (Schweinegülle), x: Dauer der Güllagerung [d], ←↑: Distanzen, ↓: 7.7 % bis 9.2 %: Hangneigungen

Abb. 3.5: Lage der Testplots auf der Ackerfläche und Applikation der Testsubstanzen in **A**: Serie 1 und 2 sowie **B**: Serie 3

Die Lage der insgesamt 15 Testplots auf beiden Flächen war dabei so angeordnet, dass eine flächenmäßige Überschneidung weitestgehend ausgeschlossen wurde, um in jeder Serie die Versuche auf einer Fläche durchführen zu können, die frei an Rückständen der Testsubstanzen aus der gleichen Wirkstoffklasse war (**Abb. 3.5** und **3.6**). Diese Flächenanordnung war ferner durch die gleichzeitige betriebsspezifische Nutzung der Ackerfläche vorgegeben, die die von Serie zu Serie bedingt durch die praxisübliche Bodenbearbeitung Unterschiede in der Beschaffenheit des Ap-Horizontes zu berücksichtigen hatte. So erfolgte die Testgülle-Applikation in Serie 1 direkt nach der Weizenernte auf die Winterweizen-Stoppel, in Serie 2 und 3 dagegen auf die Bodenoberfläche nach Grubbereinsatz.



**TG-R<sub>x</sub>**: Testgülle (Rindergülle), **x**: Dauer der Güllelagerung [d], ↓: 9.0 %: Hangneigung

**Abb. 3.6: Lage der Testplots auf der Grünlandfläche und Applikation der Testsubstanzen in Serie 1 bis 3**

### 3.4.2 Herstellung und Applikation der Testgülle

Die für Testplot-Experimente eingesetzte Rinder- bzw. Schweinegülle stammte von der FAL, Braunschweig (s. Kap. 3.1.1). Die Matrixcharakterisierung konzentrierte sich wie für die Labortests auf Gehalte an Trockensubstanz und organischer Substanz, pH und mikrobieller Aktivität. Zusätzlich wurden die Güllematrizes auf Rückstände der zu untersuchenden Testsubstanzen überprüft. Gemäß den Vorgaben der Düngeverordnung (1997) entsprach die Ausbringungsmenge von 20 kg Gülle Testplot<sup>-1</sup> der Hälfte des höchsten jährlichen Stickstoff-Gehaltes für Ackerflächen von 170 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup>. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde diese entsprechende Ausbringungsmenge auch

auf den Grünlandplots appliziert.

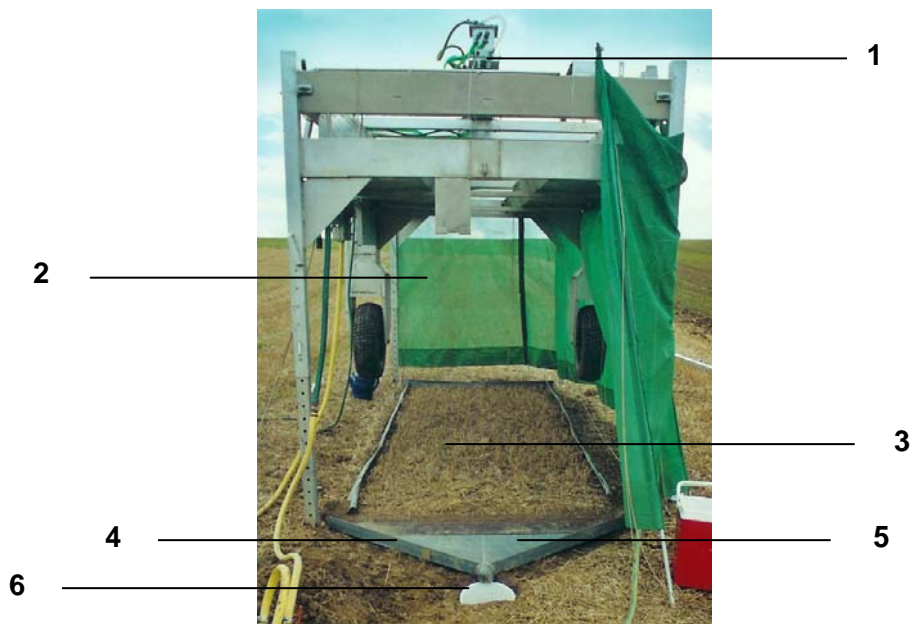
Die Testsubstanzen wurden als Original-Veterinärpharmaka angewendet. Zur Untersuchung des Verhaltens der strukturanalogen Testsubstanzen wurden diese in Gemischen eingesetzt. Zur Überprüfung auf gegenseitige Beeinflussung der Testsubstanzen wurden allerdings auch Testplot-Experimente im Einzelstoffdesign durchgeführt (s. Abb. 3.5 und 3.6). In Serie 1 wurden so Konzentrationen von 10 g Testsubstanz 20 kg<sup>-1</sup> Gülle eingestellt, die in den Serien 2 und 3 auf 1 g Testsubstanz 20 kg<sup>-1</sup> Gülle vermindert wurde. Daraus resultierten Bodenoberflächenkonzentrationen von 1250 mg m<sup>-2</sup> bzw. 125 mg m<sup>-2</sup>. Der letztere Wert stimmte mit denen von den Freilanduntersuchungen von Burkhardt et al. (2005) und Boxall et al. (2002) überein. Dort ergaben sich nach Gülleausbringung Sulfonamid-Konzentrationen von 150 bzw. 120 mg m<sup>-2</sup>. Zur Simulation einer kurzfristigen Güllelagerung wurde die so präparierte Testgülle 1 bis 9 Tage gelagert, in denen die Veterinärpharmaka einer durch Abbau und Sorption bedingten Alterung unterlagen. Die unterschiedliche Lagerungsdauer ergab sich aus unterschiedlichen Startzeiten für die einzelnen Testplot-Experimente, die durch die technisch aufwendige Reinstallation des Schwenkdüsenregners von Testplot zu Testplot, durch unterschiedliche Witterungsbedingungen und die technischen Vorgaben der praxisüblichen Bodenbearbeitung zur Einarbeitung der Testgülle bedingt waren. Unmittelbar vor der Applikation der Testgülle, die dann mit Kannen gleichmäßig auf den Testplots der Oberflächen verteilt wurde, wurden deswegen zur rückstandsanalytischen Ermittlung der tatsächlich eingesetzten Veterinärpharmaka-Konzentrationen Proben aus den einzelnen 20 kg-Gebinden entnommen. Hiernach wurde die Testgülle gemäß der Düngeverordnung auf der Ackerfläche zeitnah zur Ausbringung und vor der Beregnung mittels Grubber praxisüblich auf 15 cm Bodentiefe eingearbeitet. Auf der Ackerfläche wurden Kontrollplots (Serie 1, Plot 1 und Serie 3, Plot 3) entsprechend den Grünlandplots auch unmittelbar nach der Testgülle-Applikation ohne Einarbeitung beregnet, um hier den Einfluss der Bodenbearbeitung auf mögliche Runoff-Austräge erfassen zu können.

### **3.4.3 Intensivberegnung und Runoff-Probenahme**

Zur Simulation von Starkregenereignissen wurde eine Schwenkdüsenregner für Testplot-Experimente eingesetzt (Kainz und Eicher, 1990) (**Abb. 3.7**). Dieser war mit 4



Schwenkdüsen Veejet 80/100 ausgestattet, mit der für 60 mm Niederschlag eine kinetische Regenenergie von  $1.2 \text{ kJ m}^{-2}$  erzeugt wurde (Hassel und Richter, 1992). In Kalibrierverfahren wurde die Beregnungsintensität unter Berücksichtigung der verschiedenen Hangneigungen auf  $50 \text{ mm h}^{-1}$  eingestellt. Mit einer 2-stündigen Beregnungsdauer wurde zur Simulation eines Starkregenereignisses eine Intensivberegnung durchgeführt, in dem der potentielle Austrag der Veterinärpharmaka von güllegedüngten Böden ermittelt werden konnte. Ähnliche Bedingungen fanden auch in Testplot-Experimenten zum Runoff von Sulfonamid-Antibiotika von Grünland Anwendung (Burkhardt et al., 2005). Bei Testplot-Größen von  $2 \text{ m}^2$  mit Hangneigungen von 6-9 % betrug Beregnungsdauer und Beregnungsintensität 90 min bzw.  $20 \text{ mm h}^{-1}$ . Die Untersuchungen von Kördel und Klöppel (1994) zum Runoff von Pflanzenschutzmitteln basierten auf folgenden Parametern: Beregnungsintensität  $65\text{-}75 \text{ mm h}^{-1}$ , Beregnungsdauer: 1 h mit 0.5 h Nachlaufperiode, Testplotgröße:  $4.6 \times 1.5 \text{ m}^2$ , Hangneigungen: 10-16 %.



1: Beregnungsschwenkkopf, 2: Windschutz, 3: Testplot, 4: Leitbleche,  
5: Abflussrinne, 6: Runoff-Sammler

**Abb. 3.7: Schwenkdüsenregner für Testplotstudien**

In dem 2-stündigen Beregnungszeitraum wurde der Oberflächenabfluss über die Abflussrinne quantitativ im Runoff-Sammler aufgefangen. Der erste tropfenweise Abfluss wurde als Vorlauf abgenommen. Nachdem ein kontinuierlicher Fluss zu verzeichnen war, wurde der Runoff-Sammler alle 5 bis 10 Minuten entleert und die einzelnen Volumina mittels Standzylinder bestimmt. Aus den einzelnen wässrigen Proben mit suspendierten Gülle- und Boden-Partikeln wurden Aliquote (200-1000 mL) für die rückstandsanalytischen Untersuchungen der applizierten Veterinärpharmaka entnommen, die dann wie unter Kap. 3.2 beschrieben analysiert wurden. Um die partikuläre Phase zu gewinnen, wurden die überschüssigen Runoff-Proben in einem Sedimentierbecken vereinigt. Nach 48-stündiger Sedimentation wurde der wässrige Überstand dekantiert und das Sediment entnommen. Dieses wurde bis zur rückstandsanalytischen Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

#### **3.4.4 Freiland-Monitoring**

Mit Ausnahme der Kontrollplots (Serie 1, Plot 1 und Serie 3, Plot 3), die unmittelbar nach der Testgülle-Ausbringung beregnet wurden, erfolgte die erste Bodenprobenahme auf der Ackerfläche nach der Einarbeitung der Testgülle. Um dabei im Vorfeld der Beregnung keine artifiziellen Fließwege zu schaffen, erfolgte diese Probenahme mittels einer Handschaufel entsprechend der Grubberbearbeitung bis 0-15 cm Bodentiefe. Je Testplot wurden so 5 Einzelproben entnommen und zu einer Mischprobe vereinigt. Die Probenahme wurde unmittelbar nach der Beregnung fortgesetzt. Die Entnahmetiefe betrug ebenfalls 15 cm. Auf dem Grünlandstandort erfolgte die erste Probenahme (0-5 cm) unmittelbar im Anschluss an die Beregnungsexperimente. Um die Rückstandssituation im Boden auf ausgewählten Testplots unter Freilandbedingungen langfristig verfolgen zu können, erstreckten sich die Probenahmen über einen Zeitraum bis hin zu maximal 663 Tage. Weitere Bodenproben aus der 0-15 cm-Schicht wurden auf der Acker- und Grünlandfläche außerhalb der Testplots entnommen, um die Grundbelastung dieser Böden mit den zu untersuchenden Testsubstanzen zu kontrollieren.

Da über diese Zeitspanne hinweg auch eine mögliche Substanzverlagerung in tiefere Bodenschichten erfasst werden sollte, wurde die Entnahmetiefe auf 90 cm erweitert. Hierzu wurden mit einem 3-teiligen  $N_{\min}$ -Bohrstock jeweils 5 Einzelproben auf den

Testplots entnommen, auf dem Ackerstandort nach den Bodentiefen 0-15, 15-30, 30-60 und 60-90 cm differenziert und zu Mischproben vereinigt. Die Beprobung der 0-15 cm-Schicht berücksichtigte hier die Einarbeitung der ausgebrachten Testgülle mit dem Grubber. Auf dem Grünlandstandort erfolgte die Probennahme in den Schichten 0-5, 5-30, 30-60 und 60-90 cm. Nach gründlicher Durchmischung wurden aus den Mischproben Aliquote für die unter Kap. 3.2 beschriebenen rückstandsanalytischen Untersuchungen und die Lagerung von Rückstellproben gewonnen.

#### 4. Rückstandsverhalten von Veterinärpharmaka in Gülle und Boden

Die durch Ausscheidungen der Nutztiere in die Gülle gelangten Veterinärpharmaka können während der Lagerung bis zur Ausbringung Alterungsprozessen unterliegen, die durch den mikrobiellen Abbau, die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände bzw. die Sorption an die Feststoffmatrix bedingt werden. Aus der stoffspezifischen Persistenz und Bioverfügbarkeit dieser Rückstände ergibt sich schließlich die Umweltrelevanz der mit der Gülleausbringung verbundenen Einträge in Acker- und Grünlandböden. Dieser Aspekt findet im mehrstufigen Prüfkonzept der Europäischen Arzneimittelbehörde zur Umweltgefährdungsabschätzung von Veterinärpharmaka (EMEA, 1998, VICH, 2000, 2003) derart Berücksichtigung, dass in Phase I der Bewertung neuer Stoffe die Eintragungssituation in Böden über die Gülleausbringung mittels Expositionsabschätzung auf der Basis der Anwendungsmenge und der Anwendungsmuster bewertet wird. Ist aus der Gülleausbringung eine Überschreitung des festgelegten Schwellenwertes (Trigger) von  $100 \mu\text{g Wirkstoff kg}^{-1}$  Boden abzuleiten, sieht dieses Prüfkonzept in Phase II, Tier A, neben Tests zur ökotoxikologischen Wirkung (Dungfauna, Regenwürmer, Daphnien) auch Tests zum Rückstandsverhalten in Böden verschiedener Textur vor. Ekto- und Endoparasitika, die für die Behandlung von Weidetieren vorgesehen sind, gehen grundsätzlich in die Phase II-Bewertung ein (Koschorreck et al., 2002). In dieser sind in Anlehnung an die Richtlinien der Pflanzenschutzmittel-Zulassung (OECD, 1981a, b, 2000a, 2002a, BBA, 1986a, b) Abbauraten ( $DT_{50}$ ,  $DT_{90}$ ) und Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten ( $K_d$ ,  $K_{OC}$ -Werte) in Laborbatchexperimenten zu ermitteln, in denen die zu untersuchenden Veterinärpharmaka vorzugsweise als  $^{14}\text{C}$ -markierte Radiotracer, gelöst in einem geeigneten Lösungsmittel, zu den Bodenproben dotiert werden. Damit bleiben aber der Eintragungspfad in Böden durch die Ausbringung von Gülle sowie das Verhalten der Veterinärpharmaka in der Gülle während ihrer Lagerung unberücksichtigt.

Genau hier setzt das Runoff-Projekt an. Mit der Zielsetzung, den realen Eintragungspfad für Veterinärpharmaka in Böden in den Testplot-Experimenten so praxisnah wie möglich zu simulieren (s. Kap. 5), war es absolut folgerichtig, dieses Testdesign bereits bei der Anwendung der Labortestsysteme umzusetzen. Hier ergab sich aufgrund des Einsatzes der Testsubstanzen als  $^{14}\text{C}$ -markierte Radiotracer der entscheidende Vorteil, bereits im Vorfeld Erkenntnisse über das Rückstandsverhalten in Gülle und Boden zu sammeln, um dieses dann auch in die Auswertung der Resultate aus den Testplot-Experimenten unter Freilandbedingungen einfließen zu lassen. Diesbezüglich leistete

das Runoff-Projekt wesentliche Vorarbeiten für das ebenfalls vom Umweltbundesamt geförderte und im Institut für Ökologische Chemie und Abfallanalytik, TU Braunschweig, bearbeitete Forschungsvorhaben "Untersuchungen des Rückstandsverhaltens von Veterinärpharmaka in Gülle und Boden – Ausarbeitung eines Methodenkataloges mit Richtliniencharakter" (kurz: Gülle-Projekt), in dem die Methodenentwicklung konsequent weiter verfolgt wird.

In den folgenden Kapiteln werden die Resultate der Labortests denen aus den Testplot-Experimenten vorangestellt. Dabei werden die Sulfonamide Sulfadiazin, Sulfamethoxazol und Acetyl-Sulfamethoxazol gemeinsam betrachtet, um das Verhalten von Strukturanaloga, aber auch das von Ausgangsverbindung und korrespondierendem Metaboliten gegenüberzustellen. Der erste Aspekt trifft auch für die Ergebnisdarstellung der Benzimidazole zu. Anschließend folgen die Erläuterungen zu dem Makrolid-Antiparasitikum Ivermectin. In Ergänzung zu den Betrachtungen der jeweiligen Rückstandssituation werden in diesem Kapitel auch die Ergebnisse aus den ökotoxikologischen Tests diskutiert.

## **4.1 Stabilität in Gülle**

### **4.1.1 Sulfonamide**

Die Stabilität der Sulfonamide in Gülle wurde hauptsächlich in Rindergülle untersucht, da diese auch in den Freilandexperimenten zum Einsatz kam und somit eine vergleichende Ergebnisbetrachtung möglich war. Da Sulfadiazin jedoch auch zur Behandlung von Schweinen eingesetzt wird (Linke und Kratz, 2001, Winckler et al., 2004), wurde exemplarisch auch das Abbauverhalten von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in Schweinegülle getestet. Die Rückstandsdynamik von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin war in beiden Güllematrizes wesentlich durch die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände (NER) gekennzeichnet. In Rindergülle nahm so die Extrahierbarkeit mit Ethylacetat, das in vorgeschalteten Tests mit Wiederfindungsraten von 89 % gegenüber Methanol (35 %) das effizientere Lösungsmittel war (Höltge, 2005), bereits innerhalb von 7 Tagen auf 46 % ab. Nach 102 Tagen betragen diese Anteile noch 5 % der anfangs applizierten Radioaktivität, so dass ca. 80 % auf die nicht-extrahierbare Fraktion entfielen. Durch die Nachextraktion mit salz-

saurem Methanol wurde dieser Anteil auf 56 % verringert (Kreuzig und Höltge, 2005).

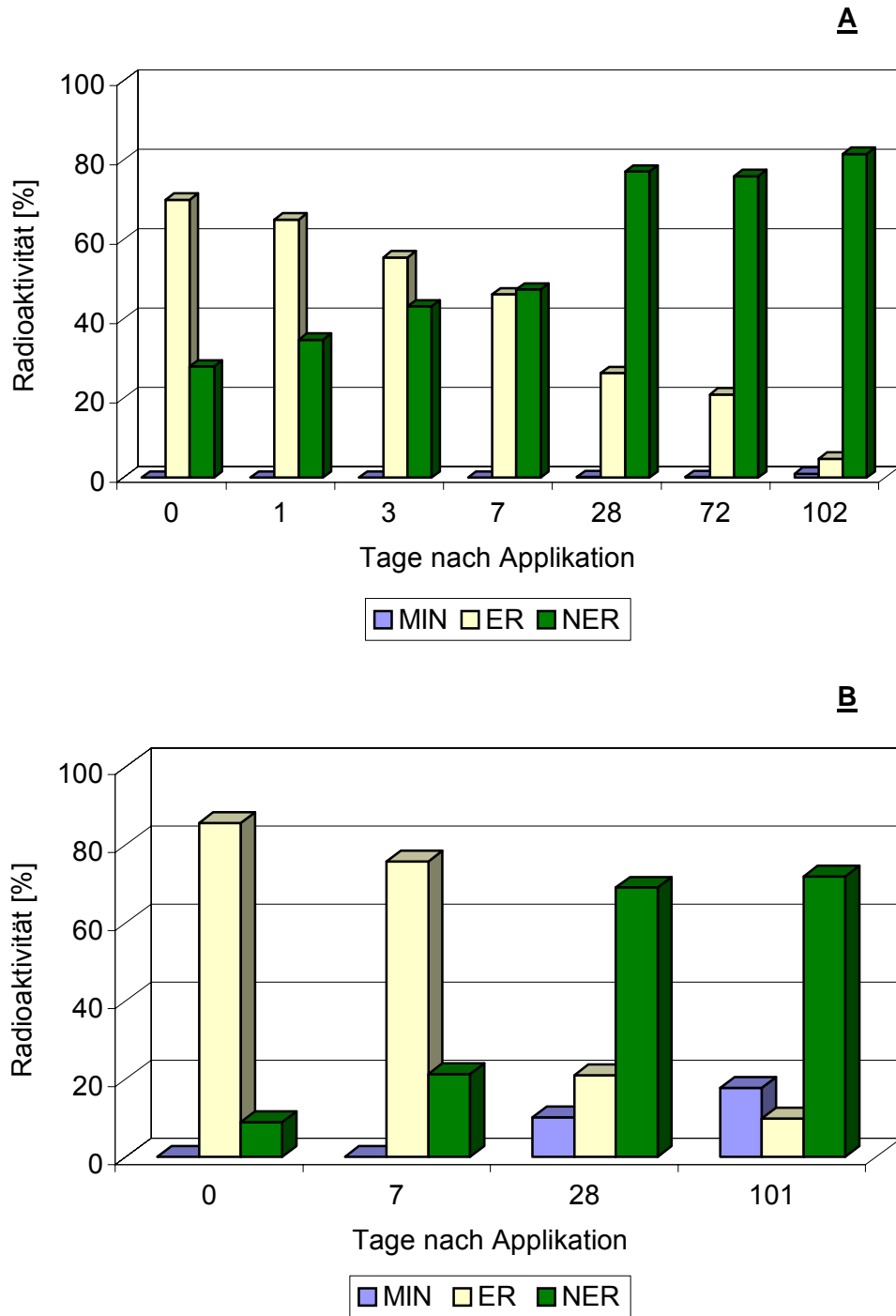


Abb. 4.1: Stabilität von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in A: Rindergülle und B: Schweinegülle

Basierend auf dem RTLC-Screening errechneten sich für <sup>14</sup>C-Sulfadiazin als die unveränderte Ausgangsverbindung<sup>4</sup> DT<sub>50</sub>- und DT<sub>90</sub>-Werte von 17 bzw. 56 Tagen (Timme et al., 1986). Unter Einbeziehung der Mineralisation von nur 1 % in 102 Tagen wird damit ein Persistenzkriterium erfüllt, das im Rahmen der Pflanzenschutzmittel-Zulassung mit < 5 % in 100 Tagen definiert wird (BBA, 1998).

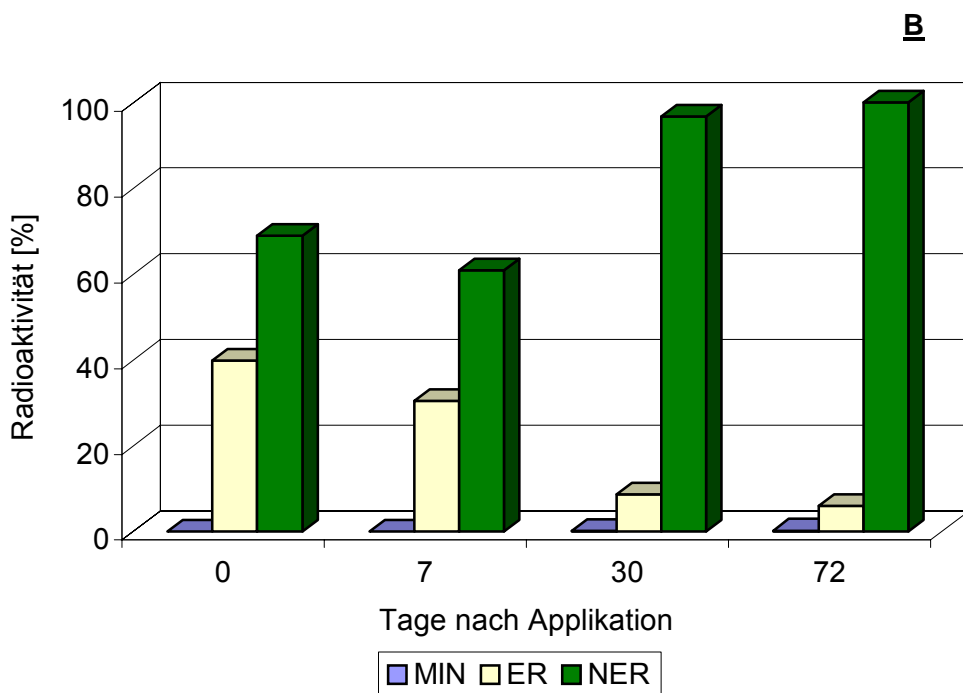
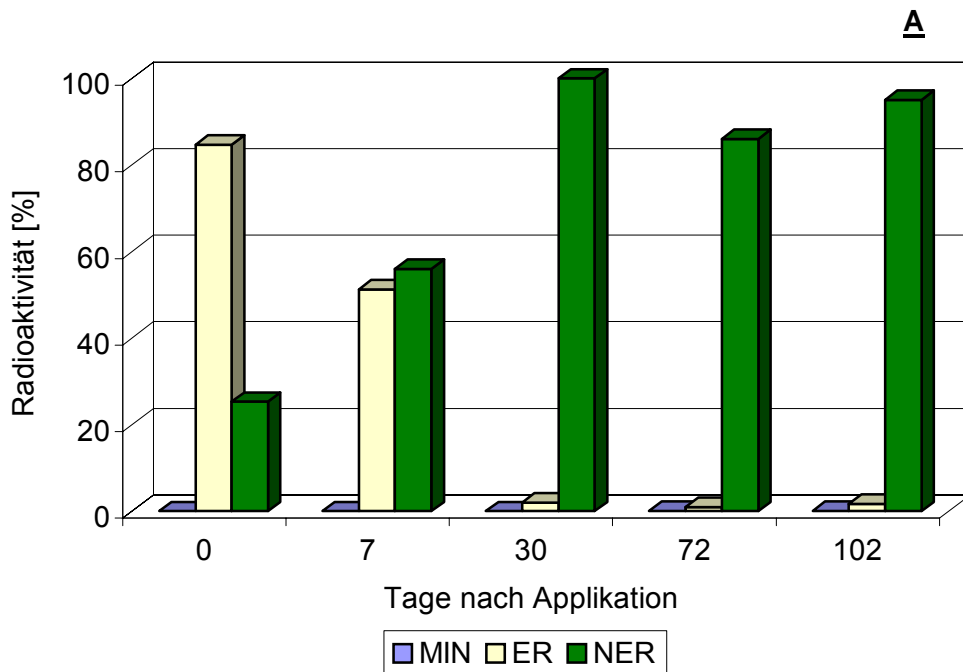
Matrixspezifische Einflüsse auf die Rückstandsdynamik von <sup>14</sup>C-Sulfadiazin sind in **Abb. 4.1** ersichtlich. In den Stabilitätstests mit Schweinegülle fällt die deutlich langsamere Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände auf. So waren die <sup>14</sup>C-Sulfadiazin-Rückstände nach 7 Tagen noch zu 76 % mit Ethylacetat extrahierbar. Nach 101 Tagen entfielen dagegen auf die Mineralisation 18 % der anfangs applizierten Radioaktivität, was auf die höhere mikrobielle Aktivität in der Schweinegülle (SIR: 14 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) als in der Rindergülle (SIR: 7 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) zurückzuführen sein könnte. Zum Versuchsende glich sich die Rückstandssituation in Schweinegülle allerdings der in Rindergülle an. So ergaben sich hier DT<sub>50</sub>- und DT<sub>90</sub>-Werte von 8 bzw. 89 Tagen.

Die Qualitätssicherung zu diesen Stabilitätstests basierte auf der Aufstellung detaillierter Massenbilanzen sowie der Durchführung der Batchtests in Doppelbestimmungen. Die in **Tab. 4.1** aufgeführten Daten verdeutlichen die Reproduzierbarkeit dieser Batchtests, die auch durch die entsprechenden Daten für die Tag-7-Proben, die für die Herstellung der Testgülle ermittelt wurden, widerspiegelt wird (s. Kap. 4.2, Tab. 4.3).

**Tab. 4.1: Radioaktivitätsbilanzen zu den Stabilitätstests mit <sup>14</sup>C-Sulfadiazin in Rinder- (RG) und Schweinegülle (SG)**

Batchtest	28/a <sub>RG</sub>	28/b <sub>RG</sub>	101/a <sub>RG</sub>	101/b <sub>RG</sub>	101/a <sub>SG</sub>	101/b <sub>SG</sub>
MIN [%]	0.1	0.2	1	0.8	18	19
ER [%]	26	23	5	7	10	7
NER [%]	77	73	82	85	72	75
Bilanz [%]	103	96	88	93	100	101

<sup>4</sup> In der Ergebnisdarstellung zum Metaboliten-Screening werden die jeweiligen Ausgangsverbindungen mit z.B. "<sup>14</sup>C-Sulfadiazin als unveränderte Ausgangsverbindung" ausgewiesen. Die Bezeichnungen z.B. "<sup>14</sup>C-Sulfadiazin-Rückstände" bzw. "% der applizierten Radioaktivität" beziehen sich auf die Gesamt-Rückstände, ohne das hier zwischen Ausgangsverbindung und Umwandlungsprodukten differenziert wurde.



**Abb. 4.2 : Stabilität von A: <sup>14</sup>C-Sulfamethoxazol und B: <sup>14</sup>C-Acetyl-Sulfamethoxazol in Rindergülle**

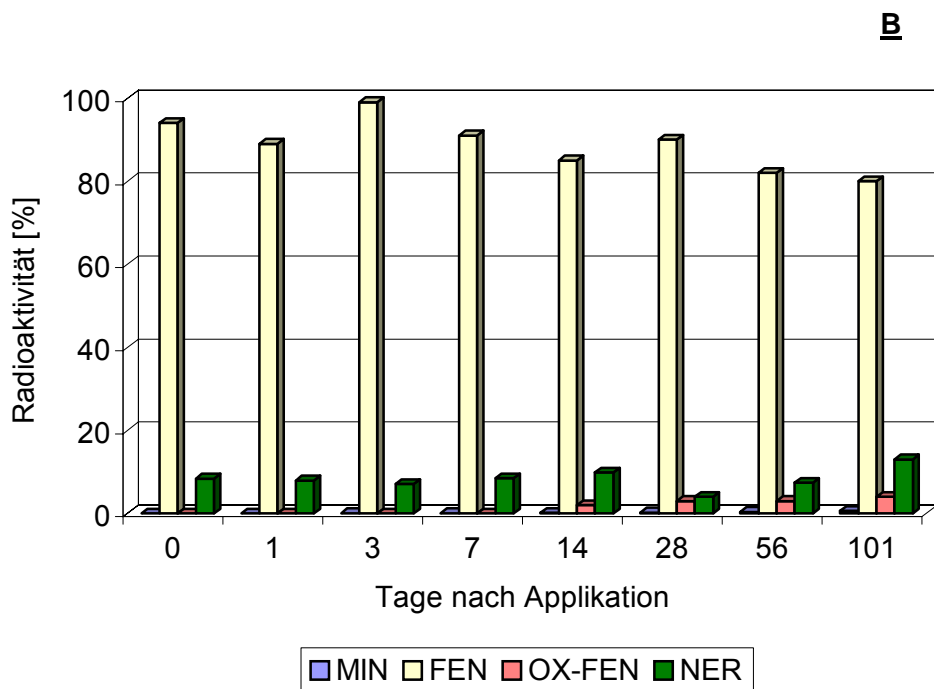
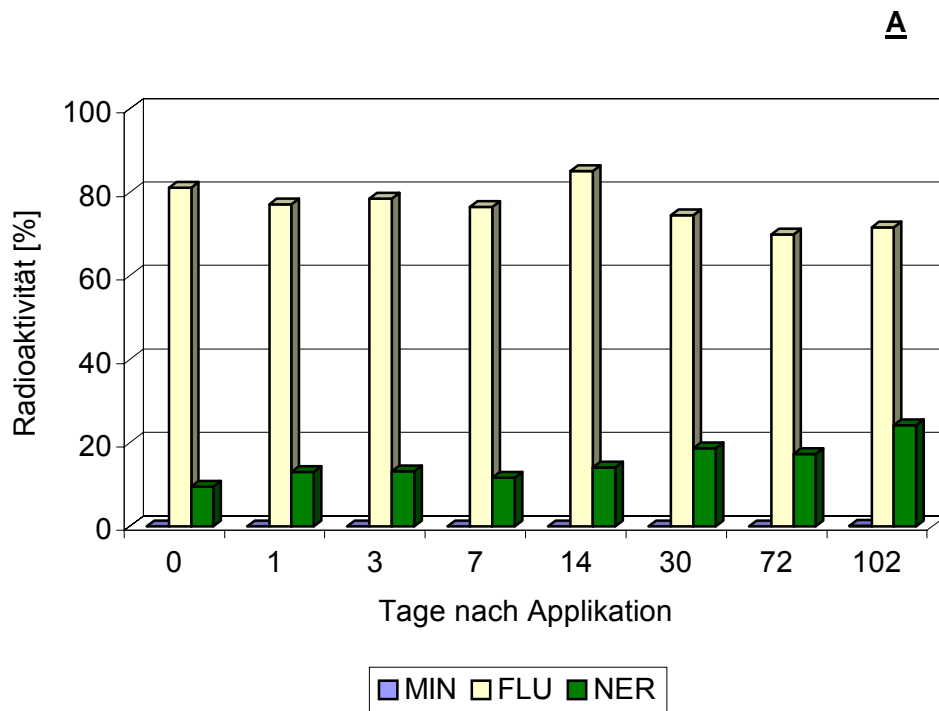
Die Stabilitätstests mit <sup>14</sup>C-Sulfamethoxazol und <sup>14</sup>C-Acetyl-Sulfamethoxazol in Rindergülle verdeutlichen ebenfalls die hohe Affinität der Sulfonamide zur Rindergüllema-



trix. So nahm die Extrahierbarkeit der  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol-Rückstände mit Ethylacetat während der ersten Inkubationsintervalle ab. Der Einsatz von Ethylacetat (102 %) führte in Vortests dabei zu höheren Wiederfindungsraten als Methanol (73 %). Nach 7 Tagen lag die applizierte Ausgangsverbindung in den Ethylacetat-Extrakten noch als Hauptkomponente vor, um dann in der Tag-102–Probe auf 0.2 % der Ausgangsaktivität abzufallen. Die nicht-extrahierbaren Rückstände erreichten in den Tag-30–Proben das Maximum. Diese bestimmten dagegen die Rückstandsdynamik von  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol bereits unmittelbar nach der Applikation der Standardlösung (**Abb. 4.2**). Der Anfangswert von 69 % stieg danach bis zum Maximum in der Tag-30–Probe an. Obgleich für Ethylacetat unmittelbar nach der Dotierung dieser Testsubstanz eine Extraktionseffizienz von 94 % (Methanol: 67 %) festgestellt wurde, entfielen wenige Stunden nach der Standard-Applikation in diesen Extrakten nur noch 39 % der applizierten Radioaktivität auf unverändertes  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol. Dieser Anteil sank innerhalb von 7 Tagen auf 20 % ab, was mit einem Anstieg des  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol-Gehaltes von 0.4 auf 6 % einherging. Somit zeigte sich, wie bereits von Langhammer (1989) für Acetyl-Sulfadimidin beschrieben, dass es in Gülle auch für  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol zu einer Deacetylierung und somit zu einem Konzentrationsanstieg von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol kommt.

#### 4.1.2 Benzimidazole

Die Stabilität der Benzimidazol-Antiparasitika wurde aufgrund ihrer überwiegenden Anwendung in der Schweinehaltung in Schweinegülle getestet. Aus **Abb. 4.3** wird ersichtlich, dass beide untersuchten Strukturanaloga in dieser Matrix einem langsamen Abbau unterlagen. Nach mehr als 100 Tagen waren so für  $^{14}\text{C}$ -Flubendazol 72 % und für  $^{14}\text{C}$ -Fenbendazol 80 % der anfangs applizierten Radioaktivität mit Ethylacetat als unveränderte Ausgangsverbindung extrahierbar. Auch hier war Ethylacetat (106 bzw. 92 %) gegenüber Methanol (70 bzw. 44 %) das effizientere Lösungsmittel. Für Flubendazol ergab das RTLC-Screening der Ethylacetat-Extrakte unter Verwendung von zwei Laufmitteln, dass die gesamte extrahierte Radioaktivität ausschließlich der applizierten Ausgangsverbindung zuzuordnen war.



**Abb. 4.3: Stabilität von A: <sup>14</sup>C-Flubendazol (FLU) und B: <sup>14</sup>C-Fenbendazol (FEN) in Schweinegülle**

Für Fenbendazol dagegen trat bereits 14 Tage nach Applikation der Metabolit Oxfendazol (OX-FEN) auf, dessen Gehalt bis zum Tag 101 auf 5 % der anfangs applizierten

Ausgangsaktivität anstieg. Der geringfügig niedrigere Anteil extrahierbarer Rückstände für <sup>14</sup>C-Flubendazol wurde durch eine stärkere Festlegung in der Güllematrix kompensiert. So lag der Anteil nicht-extrahierbarer Rückstände in Schweinegülle für <sup>14</sup>C-Flubendazol nach 102 Tagen mit 24 % höher als in den vergleichbaren Untersuchungen mit <sup>14</sup>C-Fenbendazol (13 %). Für beide Benzimidazol-Derivate wurde bei einer <sup>14</sup>C-Kohlendioxid-Freisetzung von insgesamt 0.04 bzw. 0.6 % nur eine geringe Mineralisation ermittelt.

Bezüglich der Qualitätssicherung ergaben sich für <sup>14</sup>C-Flubendazol in den Tag-7-Proben  $0.004 \pm 0.002$  % für die Mineralisation,  $79.0 \pm 2.5$  % für extrahierbare und  $9.2 \pm 2.4$  % für nicht-extrahierbare Rückstände. Die Bilanzen lagen bei  $88.2 \pm 0.1$  %. Die Ergebnisse für <sup>14</sup>C-Fenbendazol aus den doppelbestimmten Tag-28- und Tag-101-Batchtests sind in **Tab. 4.2** aufgelistet und unterstreichen ebenfalls die erzielte Reproduzierbarkeit in diesen Stabilitätstests.

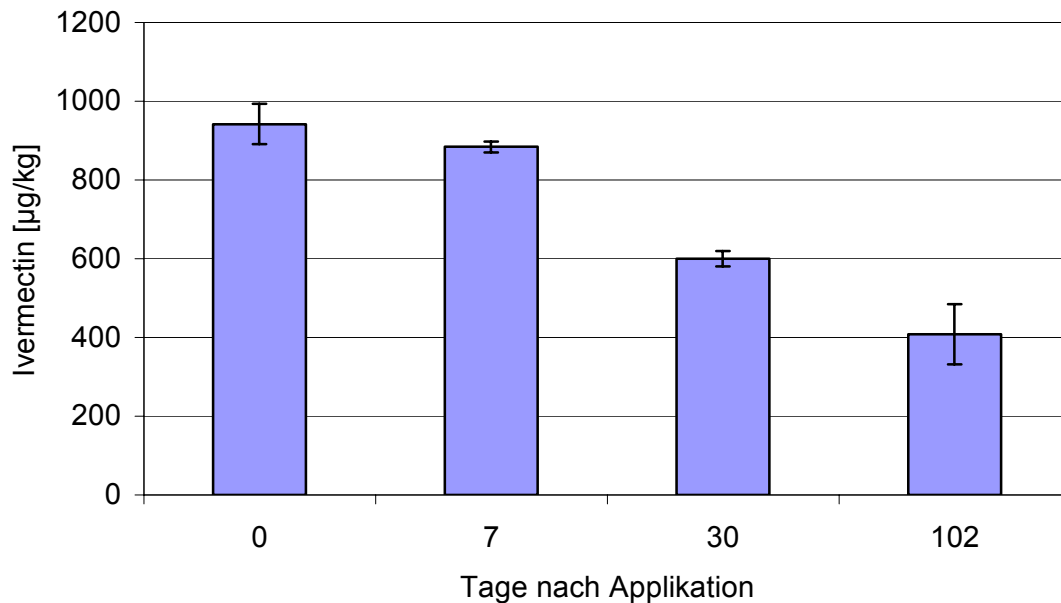
**Tab. 4.2: Radioaktivitätsbilanzen zu den Stabilitätstests mit <sup>14</sup>C-Fenbendazol in Schweinegülle**

Batchtest	28/a	28/b	101/a	101/b
MIN [%]	0.2	0.2	0.6	0.6
ER [%]	93	90	84	78
NER [%]	4	6	13	21
Bilanz [%]	97	96	98	100

#### 4.1.3 Ivermectin

Die Stabilitätstests mit Ivermectin erfolgten in Rindergülle. Zur Qualitätssicherung dieser ausschließlich rückstandsanalytisch begleiteten Untersuchungen erfolgten alle Ansätze in Doppelbestimmungen. Die ermittelten Ivermectin-Konzentrationen sind in **Abb. 4.4** wiedergegeben. Aus dieser geht hervor, dass die gemessene Anfangskonzentration von  $942 \mu\text{g Ivermectin kg}^{-1}$  Gülle bis zu Tag 102 kontinuierlich auf  $408 \mu\text{g Ivermectin kg}^{-1}$  Gülle sinkt, woraus sich nach Timme et al. (1986) ein  $DT_{50}$ -Wert von 81 Tagen errechnet. Da in diesen Stabilitätstests der Verbleib der applizierten Ausgangsverbindung

nicht durch den Einsatz eines  $^{14}\text{C}$ -markierter Radiotracer erfasst werden konnte, entzieht sich Ivermectin einer detaillierten Massenbilanz, anhand derer eine vergleichende Gegenüberstellung mit den untersuchten Sulfonamiden und Benzimidazolen erfolgen könnte.



**Abb. 4.4 : Stabilität von Ivermectin in Rindergülle**

#### 4.2 Rückstandssituation in der Testgülle

Zur Simulation des praxisnahen Eintragspfades für Veterinärpharmaka in Böden wurde auf der Basis der durchgeführten Stabilitätstests in Rinder- bzw. Schweinegülle Testgülle hergestellt, mit der die Testsubstanzen als definiert gealterte Rückstände in die Labortestsysteme zur Untersuchung von Abbau und Sorption in Boden eingebracht wurden. Mit diesem neuen Versuchsdesign konnte bezüglich der simulierten Güllelagerung aufgrund der auf 24 Monate limitierten Laufzeit des Runoff-Projektes nur eine Rückstandsalterung von 7 Tagen betrachtet werden. Für  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin und  $^{14}\text{C}$ -Flubendazol wurden exemplarisch auch die Güllelagerung von 30 bzw. 72 Tagen betrachtet. Wie diese Stabilitätstests in Gülle jedoch auswiesen, führte bereits die kurzfri-

stige Güllelagerung zu einer komplexen Rückstandssituation, die sich durch die Abbau- und Sorptionsprozesse der jeweilig dotierten Testsubstanz ergibt. Hieraus resultierte, dass mit der Testgülle-Applikation nicht nur die Ausgangssubstanz, sondern auch gebildete Metaboliten und nicht-extrahierbare Rückstände in den Labortestsystemen Eingang fanden. Im Vergleich zur Standard-Applikation, in denen die Testsubstanzen in einem geeigneten Lösungsmittel dotiert werden, wird die Komplexität der Rückstandssituation auch durch die Gülle selbst erhöht. Zum einen stellt diese eine sorptive organische Feststoffmatrix dar, die aber auch als "dissolved organic carbon" lösungsvermittelnde Eigenschaften aufweisen kann. Zum anderen werden mit der Gülle-Applikation auch mikrobiell leicht abbaubare organische Substanzen und Nährstoffe ausgebracht, die in den mikrobiell aktiven Bodenproben noch zu einer Steigerung der Mikroorganismenaktivität beitragen können.

**Tab. 4.3: Zusammensetzung der <sup>14</sup>C-Sulfadiazin-Rückständen in der Testgülle**

<b>Batchtest</b>	<b>Test 1</b>	<b>Test 2</b>	<b>Test 3</b>	<b>Test 4</b>	<b>Test 5</b>
MIN [%]	0.01	0.01	0.01	0.01	nd
SDZ [%] (R <sub>F</sub> : 0.60)	39	37	38	34	27
M1 [%] (R <sub>F</sub> : 0.05)	6	6	5	5	12
M2 [%] (R <sub>F</sub> : 0.90)	4	3	5	nd	nd
NER [%]	60	62	70	55	53
Bilanz [%]	109	108	117	93	92

#: Laufmittel: Ethylacetat; **MIN**: Mineralisation; **SDZ**: Sulfadiazin; **M1, 2**: Metaboliten; **NER**: nicht-extrahierbare Rückstände; **nd**: nicht detektiert; **R<sub>F</sub>**: RTLC-Retentionsfaktor

Zur Überprüfung dieses Versuchsdesigns auf Reproduzierbarkeit wurden die 7-tägigen Inkubationstests in Mehrfachbestimmungen durchgeführt und die Extrakte einem RTLC-Screening unterzogen, um den Gehalt der anfangs dotierten Testsubstanz zu quantifizieren. Für <sup>14</sup>C-Sulfadiazin sind die Ergebnisse in **Tab. 4.3** aufgelistet. In den Extrakten der einzelnen Stabilitätstests lag <sup>14</sup>C-Sulfadiazin noch zu 35 % als unveränderte Ausgangsverbindung vor, woraus sich eine Konzentration von 150 µg kg<sup>-1</sup> Rindergülle errechnete. Neben 2 Metaboliten traten in dieser Bilanz bereits durchschnitt-

lich 60 % nicht-extrahierbare Rückstände auf. Die Mineralisation mit 0.01 % spielte wie auch in den Langzeittests eine untergeordnete Rolle.

Für die  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol-Rückstände wurden diese Tests zur 7-tägigen Güllelagerung in Dreifachbestimmung durchgeführt. In diesen Extrakten konnte  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol als unveränderte Ausgangsverbindung mit einem durchschnittlichen Gehalt von  $39 \pm 2$  % nachgewiesen werden, woraus sich eine Konzentration von  $1030 \mu\text{g kg}^{-1}$  er rechnen ließ. Die nicht-extrahierbaren Anteile erreichten in dieser Zeit  $52 \pm 1$  %. Mit Werten von 0.01 % war die Mineralisation dagegen von untergeordneter Bedeutung. Diese Testergebnisse weisen wiederum eine hohe Reproduzierbarkeit aus und geben eine zum Strukturanalogon Sulfadiazin übereinstimmende Rückstandssituation wieder. Die Unterschiede in den berechneten Konzentrationen sind hier auf die verschiedenen spezifischen Aktivitäten der Radiotracer zurückzuführen, die  $814 \text{ MBq mmol}^{-1}$  für  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin und  $148 \text{ MBq mmol}^{-1}$  für  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol betragen.

Die Stabilitätstests für die Benzimidazole zeigten für beide Testsubstanzen einen langsamen Abbau in Schweinegülle. So lag  $^{14}\text{C}$ -Flubendazol nach 7-tägiger Inkubation zu 77 % und  $^{14}\text{C}$ -Fenbendazol zu 91 % als unveränderte Ausgangsverbindung vor. Hieraus errechneten sich Konzentrationswerte von 1929 bzw.  $182 \mu\text{g kg}^{-1}$  Gülle. Diese Konzentrationsunterschiede resultierten wiederum aus den deutlich unterschiedlichen spezifischen Radioaktivitäten beider Strukturanaloga von  $120 \text{ MBq mmol}^{-1}$  für  $^{14}\text{C}$ -Flubendazol und  $1773 \text{ MBq mmol}^{-1}$  für  $^{14}\text{C}$ -Fenbendazol. Die Rückstandssituation für Ivermectin in der Testgülle wurde rückstandsanalytisch bestimmt. Danach lagen in der Rindergülle nach 7-tägiger Inkubation  $884 \pm 14 \mu\text{g kg}^{-1}$  Gülle vor.

### **4.3 Abbau in Boden**

Die Rückstandsdynamik von Veterinärpharmaka in güllegedüngten Böden wird von den konzentrationsbestimmenden Prozessen Abbau und Sorption bestimmt, die von den stoff- sowie bodenspezifischen Eigenschaften, aber auch von den Eigenschaften der Güllematrix infolge ihres Gehaltes an organischer Substanz sowie an Nährstoffen beeinflusst werden. Deswegen nimmt die Berücksichtigung des praxisüblichen Eintragspfades bereits im experimentellen Design der Labortests einen weiten Raum ein. Neben der konventionellen Standard-Applikation findet so die Testgülle-Applikation Anwendung in den Langzeittests zum mikrobiellen Abbau sowie in den Kurzzeittests

zum mikrobiellen, chemischen und photoinduzierten Abbau. Entsprechendes gilt auch für die Batch-Equilibrium-Tests zur Ermittlung von Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten, auf denen die Abschätzung der Mobilität von Veterinärpharmaka-Rückständen in Böden basieren. Entsprechend der Anordnung der hier genannten Gesichtspunkte erfolgt in diesem und im Kapitel 4.4 die stoffspezifische Betrachtung des Abbau- und Sorptionsverhaltens der einzelnen Testsubstanzen in Böden unter Laborbedingungen, der die Darstellung der Rückstandssituation unter Freilandbedingungen direkt gegenübergestellt wird.

#### 4.3.1 Sulfonamide

##### Langzeittests zum mikrobiellen Abbau

In der 102-tägigen Inkubationsperiode wurde das Abbauverhalten von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin nach Standard-Applikation in den untersuchten Tonböden von der Acker- (AD-A) und der Grünlandfläche (AD-G) aus Adenstedt sowie dem Sandboden (NW) aus Nienwohde weitestgehend durch die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände bestimmt. Während auf diese ein durchschnittlicher Anteil von 96 % entfiel, spielte die Mineralisation mit maximalen Werten von 2 % der anfangs applizierten Radioaktivität eine untergeordnete Rolle. Unter Heranziehung der in der Pflanzenschutzmittel-Zulassung definierten Persistenzkriterien, die mit der Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände  $> 70\%$  und der Mineralisation  $< 5\%$  jeweils in 100 Tagen unter Laborbedingungen beziffert werden (BBA, 1998), ist  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin als eine im Boden persistente Substanz zu bezeichnen.

Die zeitaufgelöste Betrachtung dieser Testergebnisse zeigte ferner, dass die Festlegung der  $^{14}\text{C}$ -Sulfonamid-Rückstände schneller in den Tonböden voranschreitet (**Abb. 4.5**). Eine verlangsamte Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände erfolgte dagegen im Sandboden (**Abb. 4.6**), der in diesen Tests auch den Boden mit der geringsten mikrobiellen Aktivität darstellt (s. Tab. 2.3, S. 9).

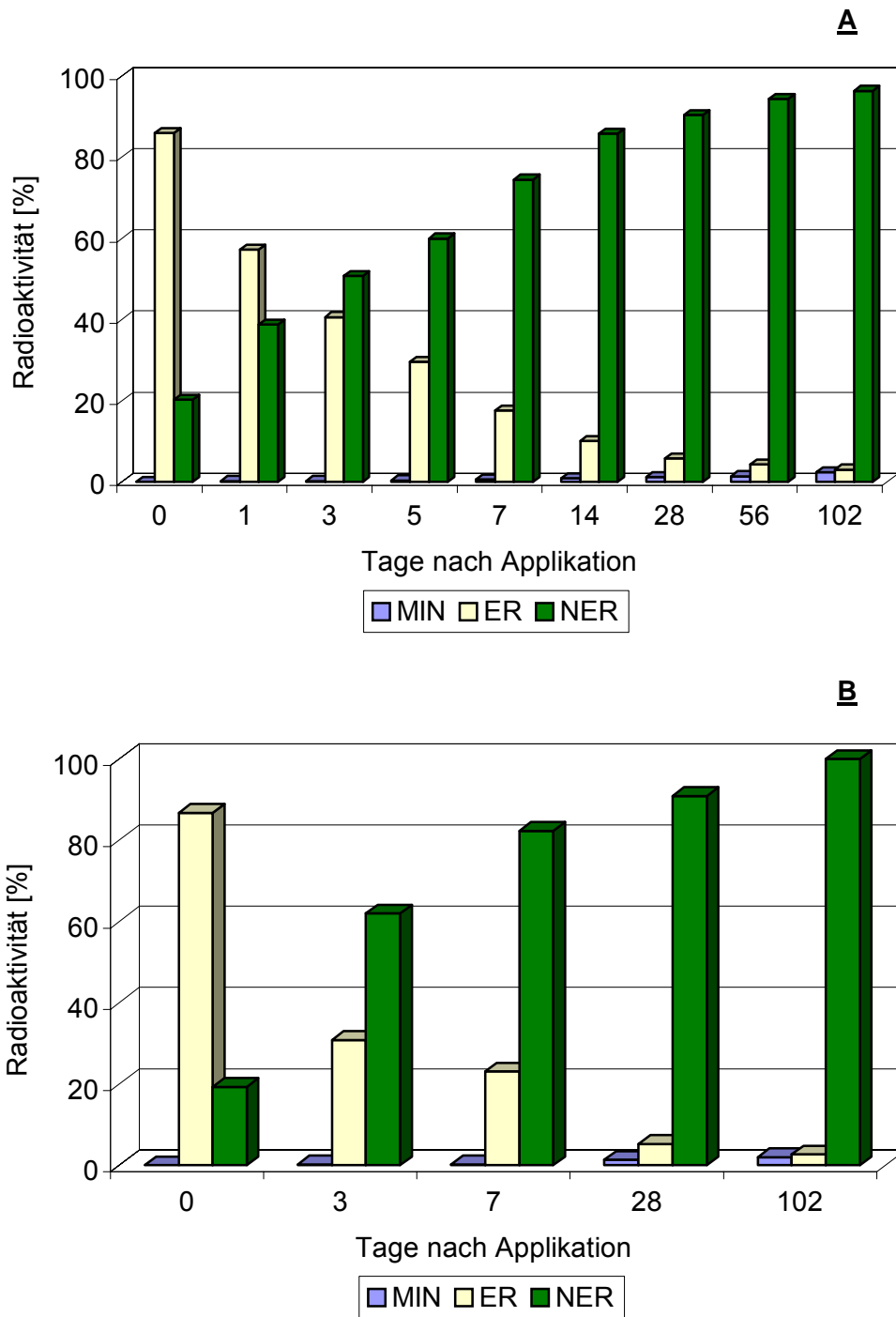


Abb. 4.5: Mikrobieller Abbau von <sup>14</sup>C-Sulfadiazin nach Standard-Applikation in schluffigen Tonböden der A: Ackerfläche (AD-A) und B: Grünlandfläche (AD-G) in Adenstedt



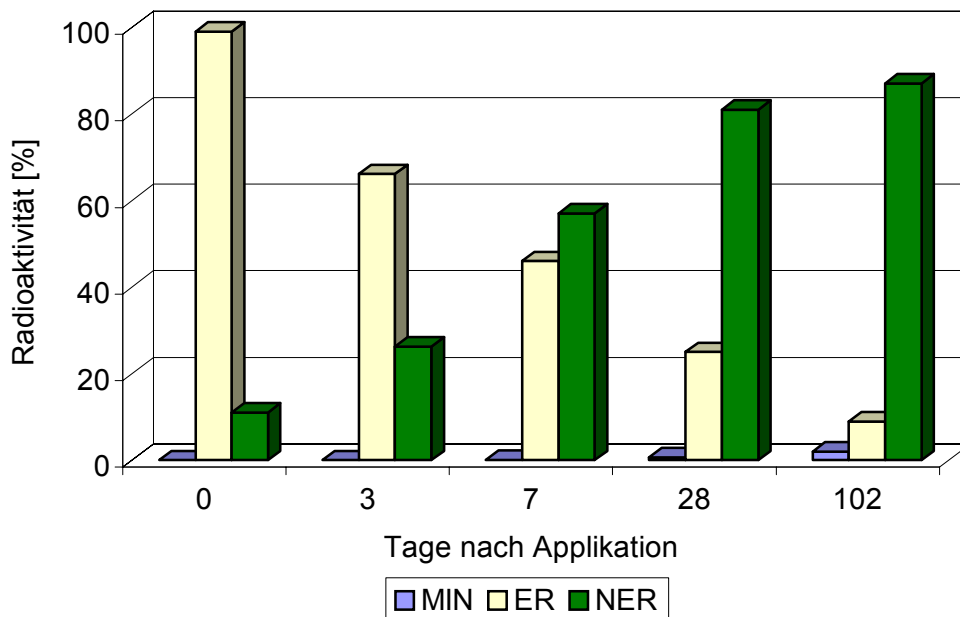


Abb. 4.6: Mikrobieller Abbau von <sup>14</sup>C-Sulfadiazin nach Standard-Applikation in schluffigem Sand (NW)

Tab 4.4: Radioaktivitätsbilanzen zu den Abbauteests von <sup>14</sup>C-Sulfadiazin nach Standard-Applikation in Böden

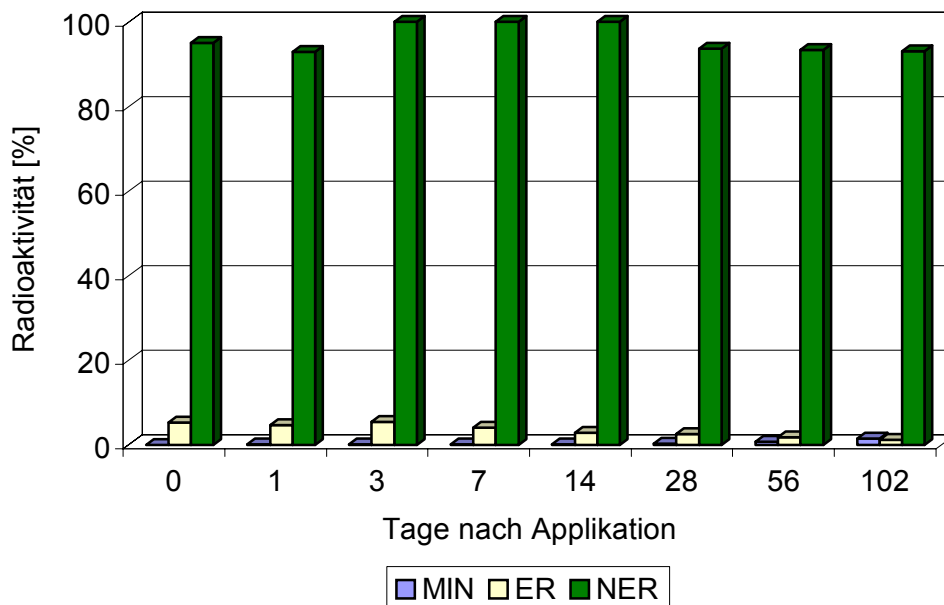
Boden	AD-A						NW	
	3/a	3/b	28/a	28/b	102/a	102/b	102/a	102/b
MIN [%]	0.2	0.1	1	1	2	2	2	2
ER [%]	41	46	6	6	3	3	9	10
NER [%]	51	53	90	90	96	97	87	86
Bilanz [%]	92	99	97	97	101	102	98	98

**AD-A:** Adenstedt Ackerboden; **NW:** Nienwohlde

Aus Gründen der Qualitätssicherung wurden auch für diese Untersuchungen zum Abbauverhalten in Böden ausgewählte Batchtests in Doppelbestimmung durchgeführt. Als Extraktionsmittel wurde wiederum Ethylacetat verwendet, das mit Wiederfindungsraten von 89 % gegenüber Methanol (60 %) die höhere Extraktionseffizienz hatte. Die Über-

einstimmung der in den einzelnen Batchtests für  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin erzielten Ergebnisse geht eindeutig aus den Radioaktivitätsbilanzen hervor, die durchschnittlich 98 % erreichen (Tab. 4.4).

Im Gegensatz zur Standard-Applikation ergab sich für  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin unmittelbar nach Testgülle-Applikation (Rindergülle) eine spontane Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände. Unabhängig von der untersuchten Bodenart wurde der bereits erwähnte 70 %-Wert in jedem Inkubationsintervall überschritten (Höltge, 2005). Die in den jeweiligen Batchtests aufgenommene Rückstandssituation ist exemplarisch für die Tests mit dem Ackerboden (AD-A) in Abb. 4.7 dargestellt.

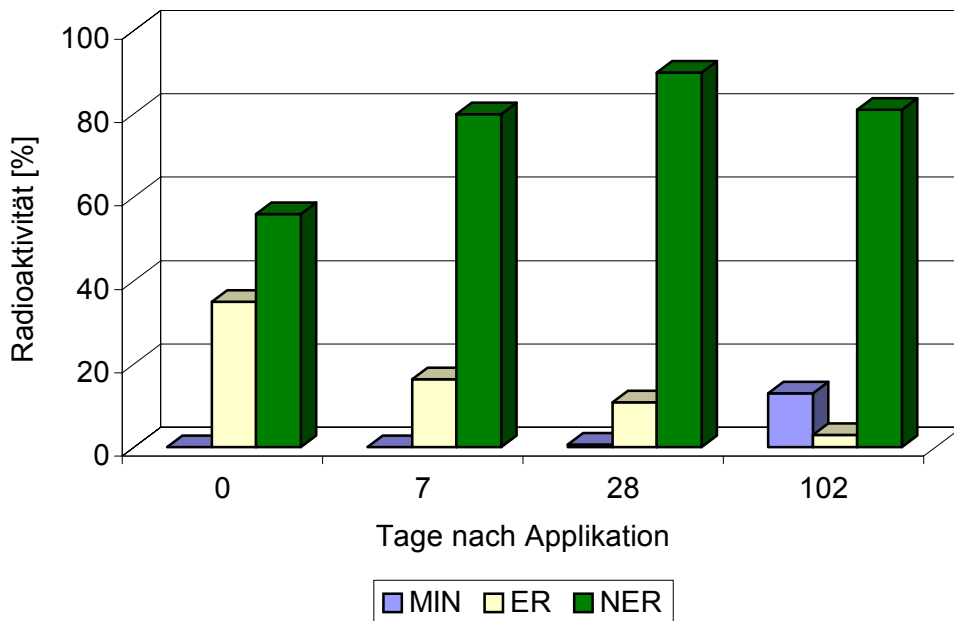


**Abb. 4.7: Mikrobieller Abbau von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in schluffigem Ton (AD-A) nach Testgülle-Applikation (Rindergülle)**

Die mit Ethylacetat extrahierbare Fraktion nahm in der 102-tägigen Inkubationsperiode sukzessive von 5 auf 1 % ab; die durchgeführten Doppelbestimmungen wiesen auch hier die Reproduzierbarkeit der Batchtests aus. Das korrespondierende Metaboliten-Screening ergab, dass  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin als unveränderte Ausgangsverbindung bereits nach 14 Tagen nicht mehr detektierbar war. Die kontinuierliche Konzentrationsabnah-

me ging mit einer Zunahme mehrerer nicht identifizierter Umwandlungsprodukte einher. Die Mineralisation spielte hier ebenfalls eine untergeordnete Rolle. Zum Versuchsende entfiel auf diese nur 1 % der anfangs applizierten Radioaktivität.

Da die Düngeverordnung (1997) die Ausbringung einer über mehrere Monate gelagerten Gülle vorsieht, wurden die Laboruntersuchungen zum mikrobiellen Abbau von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in schluffigem Ton (AD-A) nach Testgülle-Applikation exemplarisch auch mit 30 bzw. 72 Tage gelagerter Testgülle durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass unabhängig vom Lagerungszeitraum unmittelbar nach der Testgülle-Applikation mehr als 90 % der mit dem Radiotracer applizierten Radioaktivität spontan in der Bodenmatrix festgelegt wurden (Höltge, 2005).



**Abb. 4.8: Mikrobieller Abbau von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin nach Testgülle-Applikation (Schweinegülle) in schluffigem Ton (AD-A)**

Die Applikation von Testgülle, die unter Verwendung der Schweinegülle hergestellt wurde, verdeutlichte den Einfluss unterschiedlicher Güllematrizes auf die Rückstandsdynamik von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in güllegedüngten Böden. In den Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in schluffigem Ton (AD-A) fiel insbesondere die gesteigerte Mineralisation auf, die nach 102-tägiger Inkubation 13 % erreichte (**Abb.**

**4.8).** Auch fand die Festlegung in der Bodenmatrix langsamer als unter dem Einsatz von Rindergülle statt. Unmittelbar nach der Testgülle-Applikation konnten noch 35 % der Ausgangsaktivität mit Ethylacetat extrahiert werden, wobei 18 % der anfangs applizierten Radioaktivität auf  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin als unveränderte Ausgangsverbindung entfielen. Erst nach 7-tägiger Inkubation wurden 80 % nicht-extrahierbare Anteile erzielt.

Nach Standard-Applikation ergaben sich für die Rückstandsdynamik der Sulfonamid-Derivate  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol und  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol im schluffigen Ton (AD-A) ähnliche Bilder, die durch eine kontinuierliche, allerdings gegenüber  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin verlangsamte Abnahme der extrahierbaren Anteile in den ersten Inkubationsintervallen gekennzeichnet waren (**Abb. 4.9**). Zum Versuchsende hin dominierten wieder die nicht-extrahierbaren Rückstände (Höltge, 2005). So betrug für  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol und  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol nach 28 Tagen die extrahierbaren Anteile noch 18 bzw. 16 %, während die nicht-extrahierbare Fraktion 70 % erreichte und bis zum Versuchsende kontinuierlich anstieg. Zu diesem Zeitpunkt entfiel 1 % auf die Mineralisation.

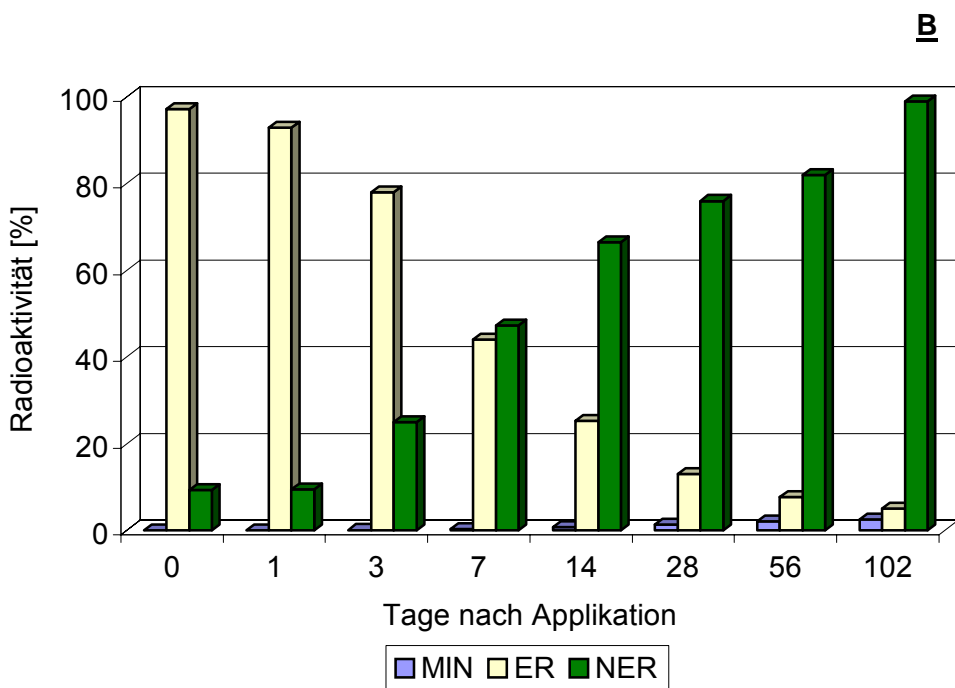
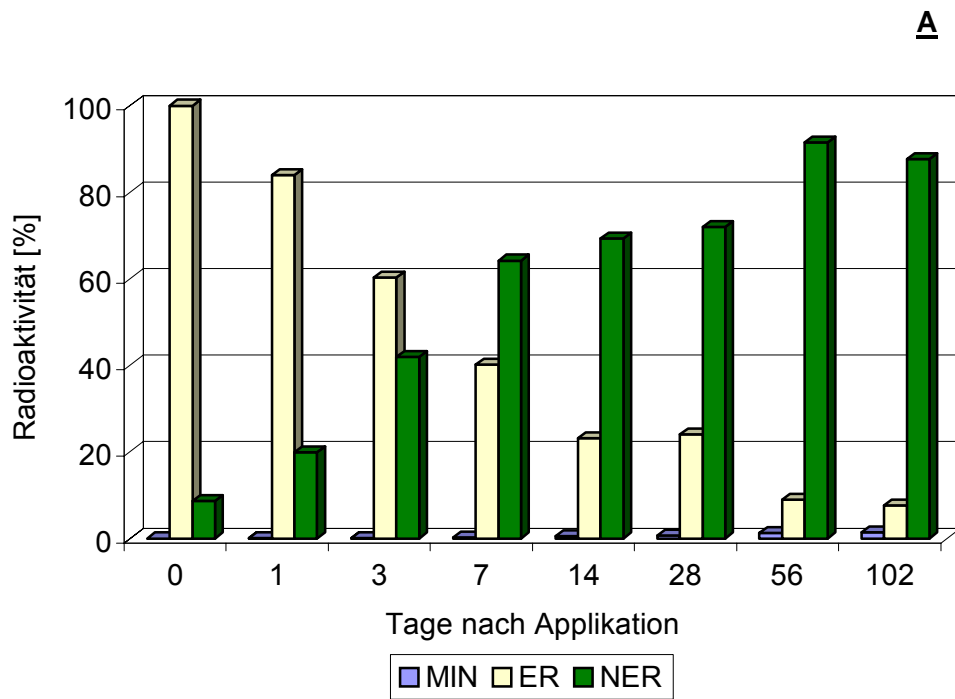
Für beide Testsubstanzen lieferte das Metaboliten-Screening interessante Informationen (**Abb. 4.10**). So traten in den jeweiligen Extrakten mehrere, teilweise für beide Sulfonamid-Derivate identische Metaboliten auf, die allerdings im Rahmen des "Runoff-Projektes" nicht identifiziert werden konnten. Für  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol als unveränderte Ausgangsverbindung kam es bereits in den ersten 3 Tagen zu einer deutlichen Konzentrationsabnahme. Zum Ende der Untersuchungen konnten in den Extrakten noch über 50 % der vorliegenden Radioaktivität als  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol detektiert werden. Nach Timme et al. (1986) kann so für  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol ein  $\text{DT}_{50}$ -Wert von 1 Tag angegeben werden.

Für  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol konnte auch im Boden die hydrolytische Umwandlung zu  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol durch das Metaboliten-Screening belegt werden. Nach der Standard-Applikation war eine deutliche Konzentrationsabnahme bereits innerhalb von 14 Tagen zu verzeichnen. In der Tag-28–Probe sowie in der Tag-102–Probe konnte in den Ethylacetat-Extrakten kein  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol mehr nachgewiesen werden. Das erneute Auftreten dieser Substanz in der Tag-56–Probe konnte nicht aufgeklärt werden. Die Konzentrationsabnahme von  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol ging zu Beginn der Untersuchungen mit einer kontinuierlichen Zunahme des  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol-Gehaltes in den Extrakten einher. Während nach 14 Tagen 16 % der anfangs

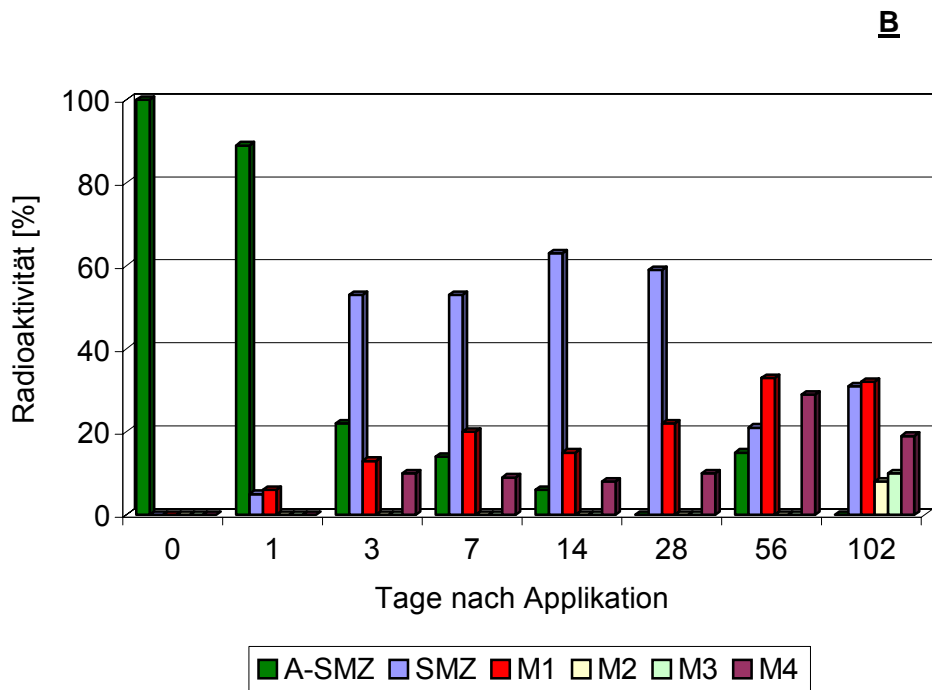
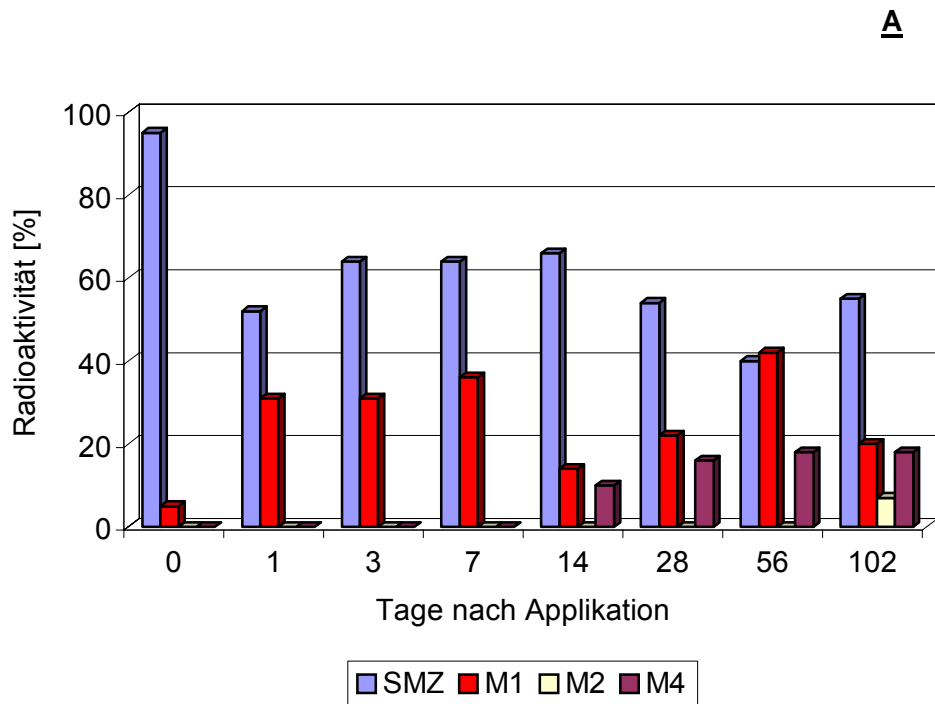
applizierten Radioaktivität auf  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol entfielen, sank dieser Wert danach bis zum Tag 102 ab.

Nach Testgülle-Applikation wurde das Abbauverhalten von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol und  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol wiederum deutlich von der raschen Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände dominiert (**Abb. 4.11**). So lag dieser Anteil für  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol bereits unmittelbar nach der Applikation bei 81 % und stieg bis zum Versuchsende am Tag 102 auf 92 % an. Für  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol zeichnete sich eine geringfügige Verzögerung ab. In der Tag-0-Probe traten neben 44 % extrahierbaren nur 57 % nicht-extrahierbare Anteile auf. Während die erst genannten sukzessive auf 1 % nach 102 Tagen abnahmen, stiegen die letzteren auf über 80 % innerhalb von 3 Tagen an.

Da bereits in den Abbautests von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin Matrixeinflüsse durch die zur Herstellung der Testgülle verwendeten Rinder- und Schweinegülle auffielen, war hier der Vergleich zwischen der Testklärschlamm- und der Testgülle-Applikation für  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol und  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol von besonderem Interesse. Die Testklärschlamm-Ansätze wurden im "Boden-Projekt" verfolgt (Kreuzig et al., 2005a). Für beide Testsubstanzen zeichnete sich in den ersten Versuchstagen eine kontinuierliche Abnahme der Extrahierbarkeit ab, mit der die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände einherging. Diese Entwicklung verlief langsamer für  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol. Dafür fiel für  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol die Mineralisation auf, die nach 102-tägiger Inkubation 11 % erreichte. Nach Testgülle-Applikation wurden dagegen vermehrt  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol-Rückstände in der nicht-extrahierbaren Fraktion nachgewiesen. Für  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol erfolgte diese Festlegung verlangsamt. Darüber hinaus zeichnete sich auch hier eine leicht erhöhte Mineralisation (3 %) ab. Die vergleichende Gegenüberstellung der Resultate aus diesen Versuchsansätzen verdeutlicht wiederum die Notwendigkeit, die Eintragungspfade von Pharmaka-Rückständen in Böden bereits in das experimentelle Design von Labortests einzubeziehen.



**Abb. 4.9: Mikrobieller Abbau von A: <sup>14</sup>C-Sulfamethoxazol und B: <sup>14</sup>C-Acetyl-Sulfamethoxazol in schluffigem Ton nach Standard-Applikation**



**Abb. 4.10: Metaboliten-Screening in den Extrakten der Batchtests mit A:  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol und B:  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol und schluffigem Ton nach Standard-Applikation**

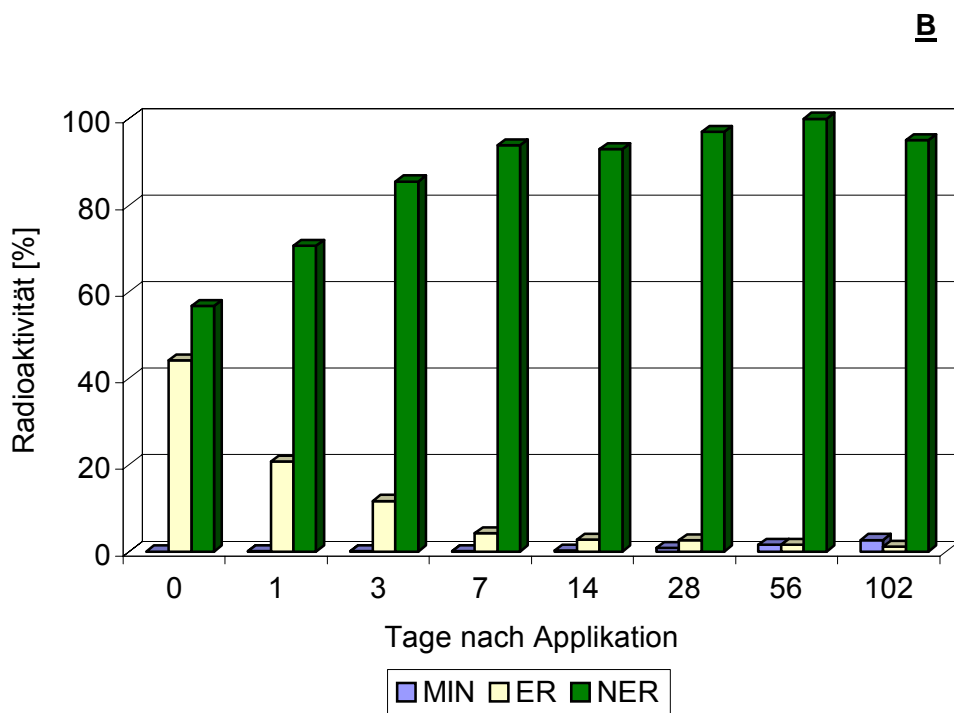
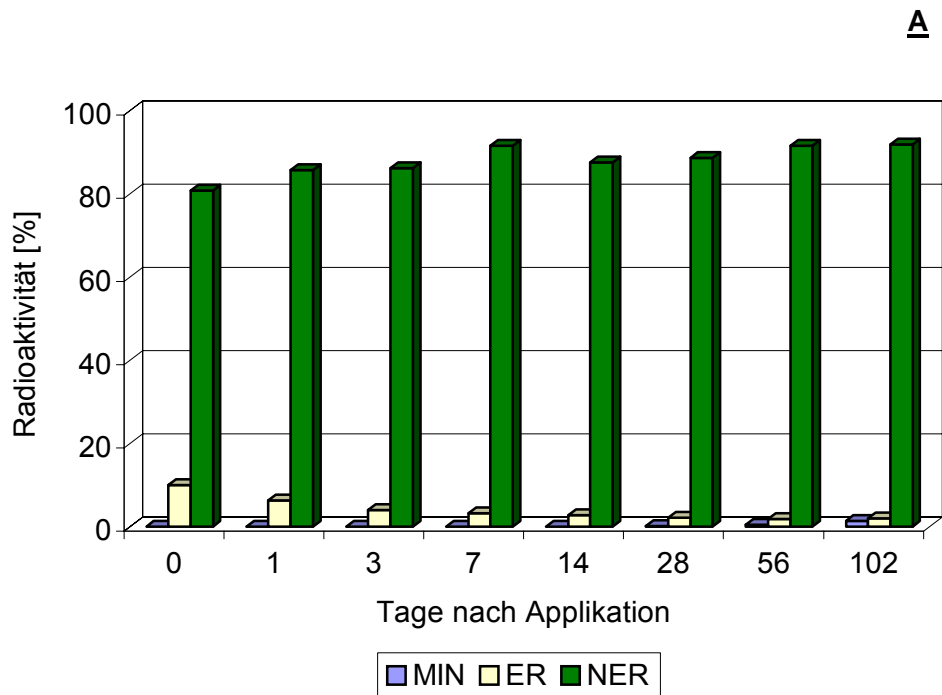


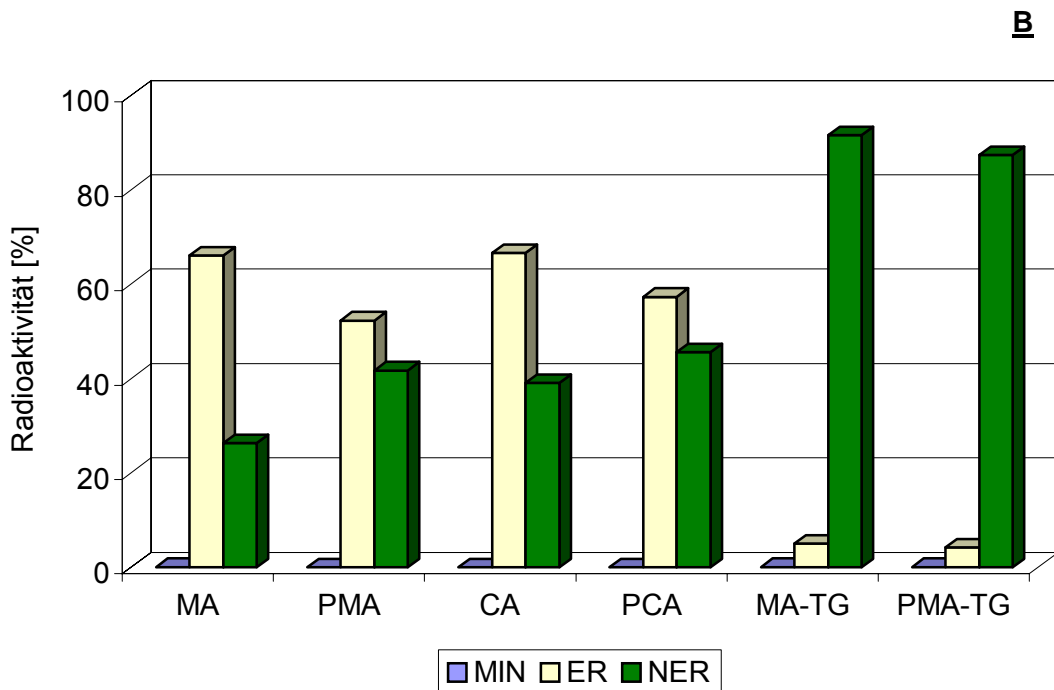
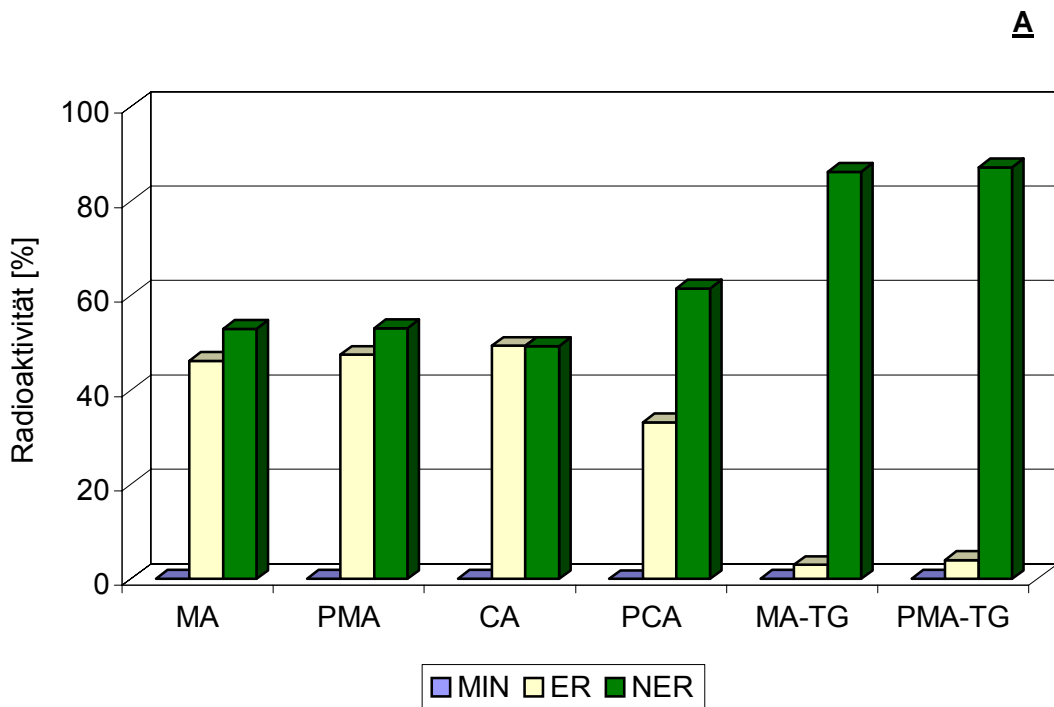
Abb. 4.11: Mikrobieller Abbau von **A**: <sup>14</sup>C-Sulfamethoxazol und **B**: <sup>14</sup>C-Acetyl-Sulfamethoxazol in schluffigem Ton nach Testgülle-Applikation



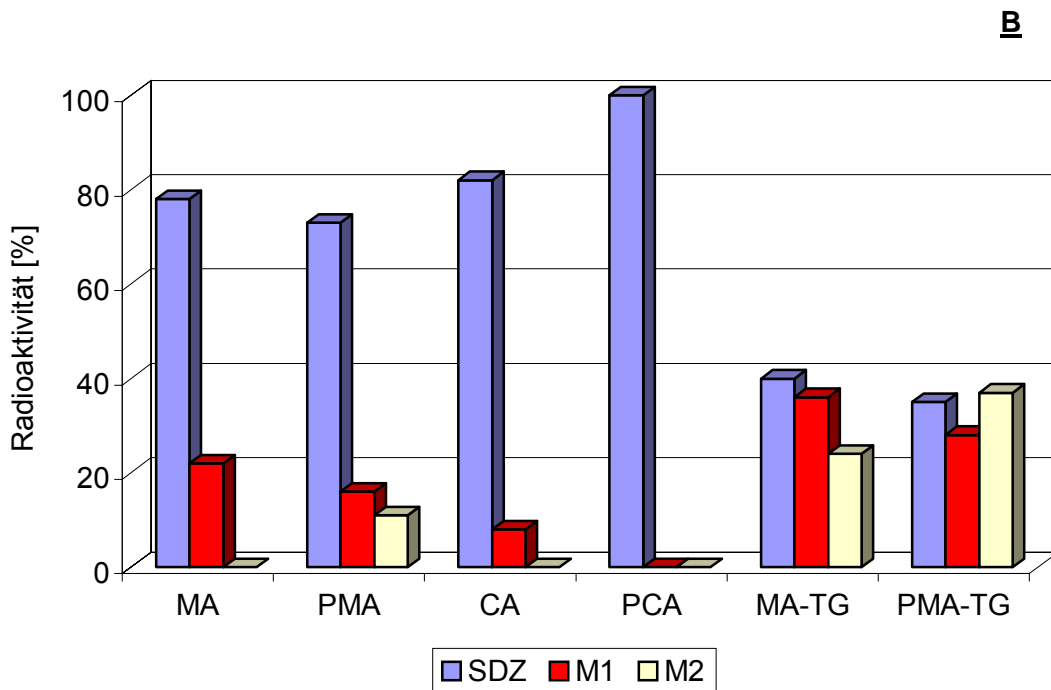
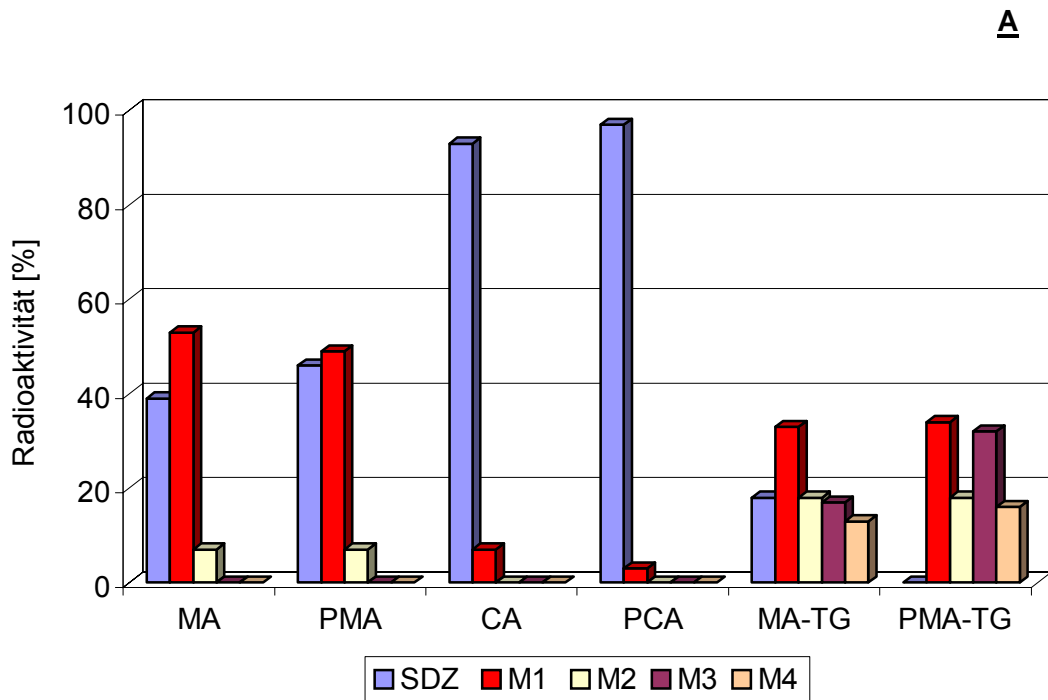
### **Kurzzeittests zum mikrobiellen, chemischen und photoinduzierten Abbau**

Neben dem mikrobiellen Abbau wurden auch der chemische sowie der photoinduzierte Abbau untersucht, um hier weitere, für Freilandbedingungen typische Einflussgrößen auf die Abbaubarkeit von Veterinärpharmaka in Böden einzubeziehen. Diese Batchtests waren auf eine 3-tägige Inkubationsperiode begrenzt. Zum einen ließ sich die Inaktivierung der mikrobiellen Bodenaktivität nicht längerfristig gewährleisten. Zum anderen war gemäß Düngeverordnung (1997) von einer zeitnah zur Ausbringung zu erfolgenden Einarbeitung der Gülle in den Ackerboden auszugehen.

Die Radioaktivitätsbilanzen dieser Kurzzeittests mit  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin sind in **Abb. 4.12** dargestellt. Hier war auffällig, dass  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin nach Standard-Applikation sowohl in der Matrix von mikrobiell aktiven und inaktiven Bodenproben festgelegt wurde. Diese Festlegung erfolgte dabei bevorzugt im schluffigen Tonboden, während die Rückstandssituation im Sandboden noch stärker von der extrahierbaren Fraktion bestimmt wurde. Die Bildung nicht-extrahierbarer  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin-Rückstände war damit nicht ausschließlich als Funktion der mikrobiellen Bodenaktivität anzusehen, wie dieses für im "Boden-Projekt" untersuchte Humanpharmaka, wie z.B. Diclofenac, Ibuprofen, Paracetamol, eindeutig nachgewiesen werden konnte (Kreuzig et al., 2003, 2005a). In diesen Kurzzeittests wurden die Unterschiede in der Rückstandsdynamik nach Standard- und Testgülle-Applikation besonders deutlich. Unter dem Einfluss der dotierten Rindergülle wurden auch in diesem kurzen Untersuchungszeitraum überwiegend nicht-extrahierbare Rückstände gebildet. Wie aus den Langzeittests zu erwarten war, spielte die Mineralisation insgesamt eine untergeordnete Rolle. Weitere Unterschiede gingen aus dem Metaboliten-Screening hervor, die sich jeweils in den Extrakten der Tonproben deutlicher als in den der Sandproben abzeichneten. Die Vergleiche zwischen den Batchtests zum mikrobiellen bzw. photoinduziert-mikrobiellen und dem chemischen bzw. photoinduziert-chemischen Abbau zeigten, dass in den extrahierbaren Fraktionen der mikrobiell aktiven Bodenproben  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin bereits von Metaboliten begleitet wurde. Die entsprechenden Fraktionen der mikrobiell inaktiven Proben wurden dagegen von der unveränderten Ausgangsverbindung dominiert (**Abb. 4.13**). Eindeutige Differenzen zwischen den Dunkel- und den Bestrahlungsexperimenten waren nach erfolgter Standard-Applikation nicht nachweisbar. Dagegen deutete das Metaboliten-Screening zu den Bestrahlungsexperimenten nach Testgülle-Applikation auf einen beschleunigten  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin-Abbau im Tonboden hin.



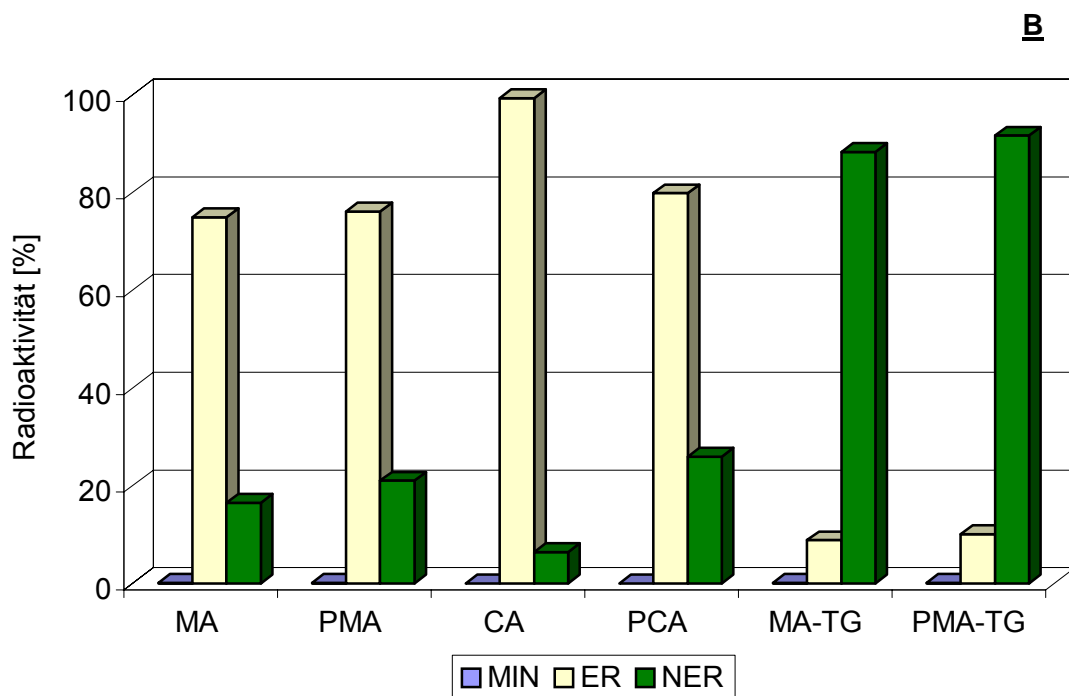
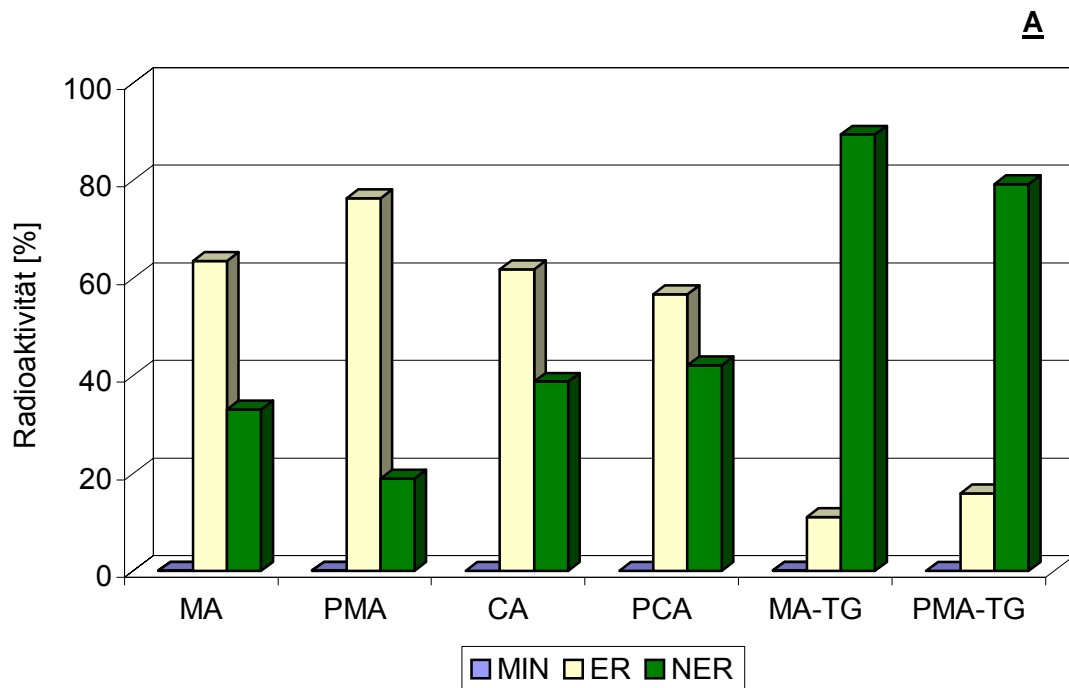
**Abb. 4.12: Mikrobieller (MA), chemischer (CA), photoinduziert-mikrobieller (PMA) und photoinduziert-chemischer (PCA) Abbau von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin A: in schluffigem Ton (AD-A) und B: in schluffigem Sand (NW) nach Standard- und Testgülle-Applikation (TG)**



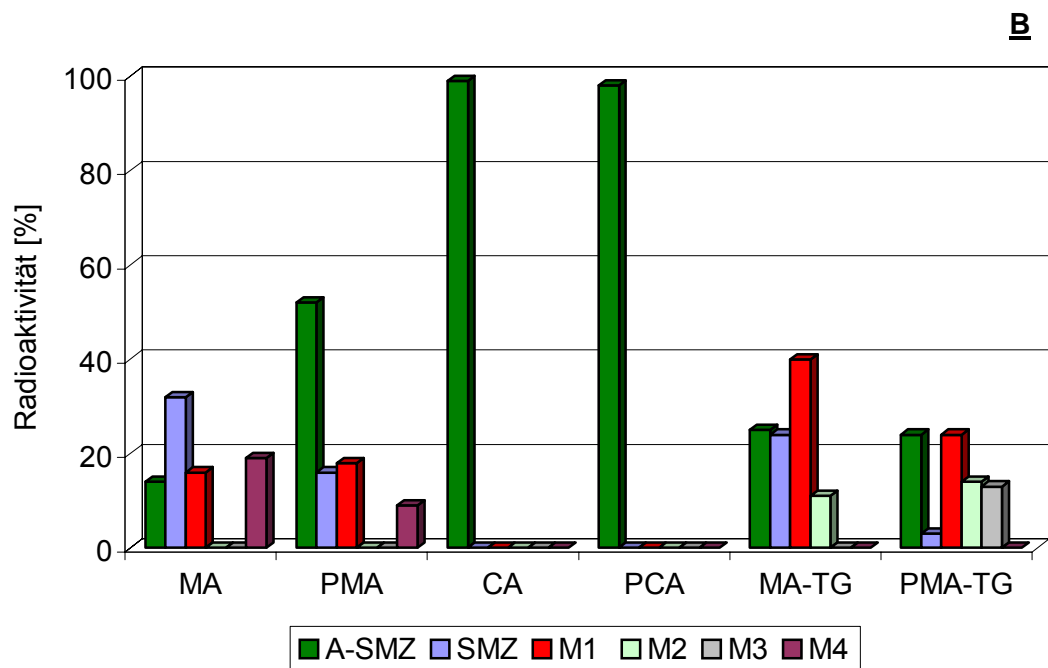
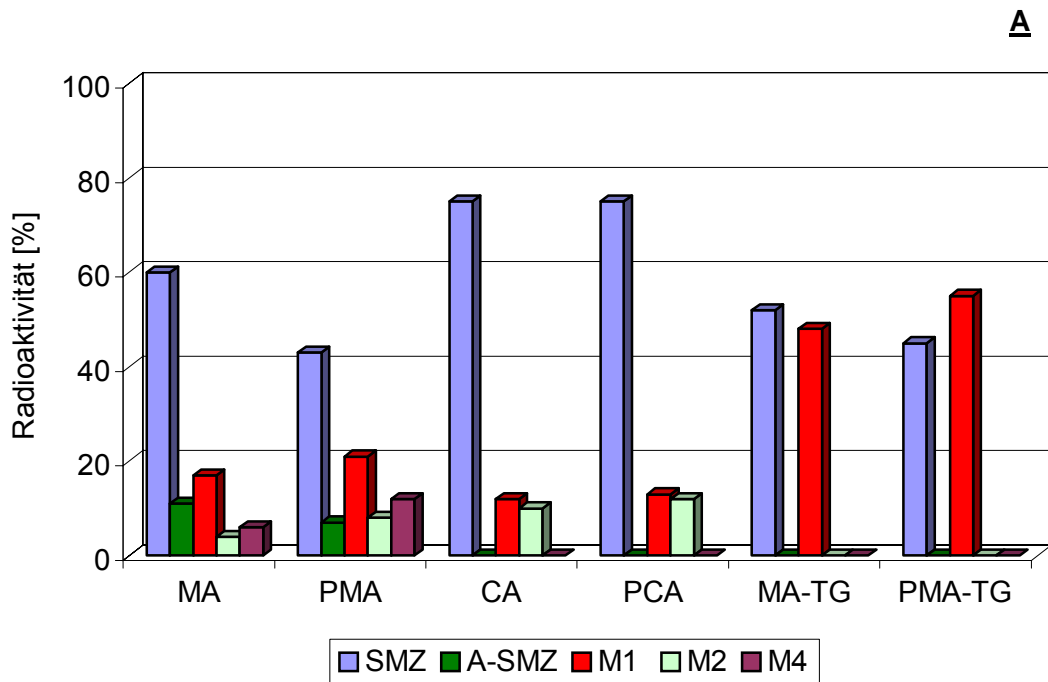
**Abb. 4.13: Screening auf  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin und Metaboliten in den Ethylacetat-Extrakten der A: schluffigen Tonproben und B: schluffigen Sandproben nach Standard- und Testgülle-Applikation**

Die Radioaktivitätsbilanzen aus den Kurzzeittests mit  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol und  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol gaben ähnliche Tendenzen wie für  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin wieder. Für beide Testsubstanzen war allerdings die geringere Affinität zur Bodenmatrix zu konstatieren. So wurden alle Extrakte aus den Batchtests nach Standard-Applikation von den extrahierbaren Fraktionen dominiert. Trotz höherer extrahierbarer Anteile als in den  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin-Abbautests überwogen nach Testgülle-Applikation wieder die nicht-extrahierbaren Rückstände (**Abb. 4.14**). Das Metaboliten-Screening stellte wiederum deutlich komplexere Rückstandssituationen dar (**Abb. 4.15**). Nach Standard-Applikation war  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in allen Extrakten in höheren Konzentrationen als die korrespondierenden Metaboliten nachweisbar. Die Unterschiede zwischen Dunkel- und Bestrahlungsexperimenten waren gering. Dieses galt auch für die Batchtests nach Testgülle-Applikation. Hier trat die unveränderte Ausgangsverbindung zusammen mit einem Hauptmetaboliten in den Extrakten jeweils in annähernd gleichen Anteilen auf. Für das Bestrahlungsexperiment zeichnete sich damit eine deutliche Differenz zu  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin ab, das unter Lichteinfluss nicht mehr detektierbar war. Aus dem Vergleich der Radioaktivitätsverteilungen der Batchtests mit  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol in mikrobiell aktiven und inaktiven Bodenproben geht deutlich hervor, dass die hydrolytische Umwandlung der applizierten Testsubstanz in  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol eindeutig auf die mikrobielle Aktivität in den Bodenproben zurückzuführen war. Schließlich lag in den Extrakten der Batchtests zum chemischen und photoinduziert-chemischen Abbau ausschließlich die unveränderte Ausgangsverbindung vor. Im Gegensatz zu  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol unterlag  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol nach Testgülle-Applikation einem beschleunigten Abbau, aus dem auch für Dunkel- und Bestrahlungsexperimente unterschiedliche Metabolitenmuster hervorgingen. So trat in letzteren der nicht-identifizierte M3-Metabolit auf, der in den anderen Versuchsvarianten nicht detektierbar war.

Die Ergebnisse aus diesen Kurzzeittests unterstreichen noch einmal deutlich die Einflüsse der Standard- und Testgülle-Applikation auf die Rückstandsdynamik der untersuchten Sulfonamid-Derivate. Entsprechendes gilt auch für den Einsatz mikrobiell aktiver und inaktiver Bodenproben. Unterschiede zwischen den untersuchten Strukturana-  
loga, den eingesetzten Proben der unterschiedlichen Bodenarten sowie zwischen Dunkel- und Bestrahlungsexperimenten treten nicht so deutlich in den Vordergrund.



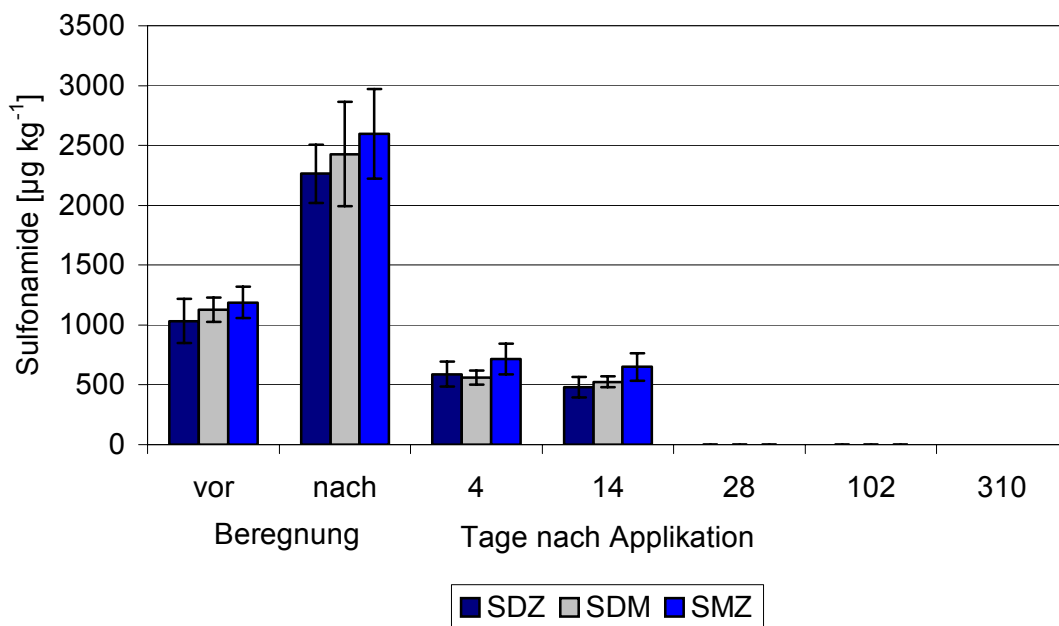
**Abb. 4.14: Mikrobieller (MA), chemischer (CA), photoinduziert-mikrobieller (PMA) und photoinduziert-chemischer (PCA) Abbau von A: <sup>14</sup>C-Sulfamethoxazol und B: <sup>14</sup>C-Acetyl-Sulfamethoxazol in schluffigem Ton (AD-A) nach Standard- und Testgülle-Applikation (TG)**



**Abb. 4.15: Screening auf A:  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol und B:  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol sowie Metaboliten in den Ethylacetat-Extrakten der schluffigen Tonproben nach Standard- und Testgülle-Applikation (TG)**

### Abbauverhalten unter Freilandbedingungen

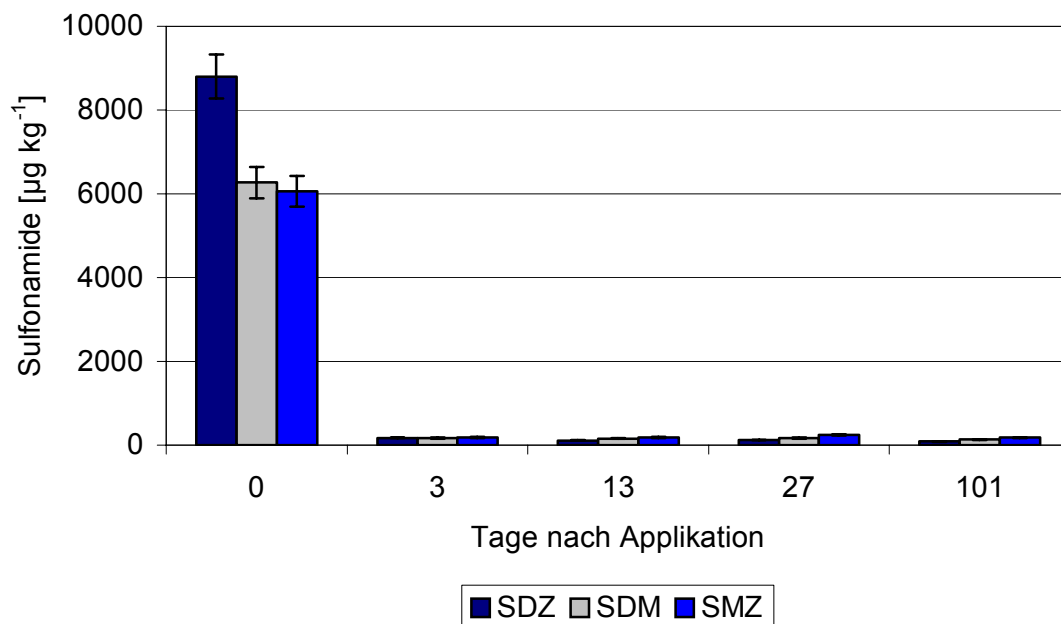
Die eigentliche Runoff-Studie wurde auch dazu herangezogen, das Rückstandsverhalten der applizierten Testsubstanzen in güllegedüngten Böden unter dem Einfluss der Intensivberegnung zu untersuchen. Damit bot sich die Möglichkeit, das in Labortestsystemen ermittelte Abbau- und Sorptionsverhalten der untersuchten Veterinärpharmaka auch unter Freilandbedingungen zu betrachten.



**Abb. 4.16: Sulfonamid-Konzentrationen in der 0-15 cm-Bodenschicht im Ackerboden (AD-A) in Serie 1 nach Testgülle-Applikation, Einarbeitung und Intensivberegnung**

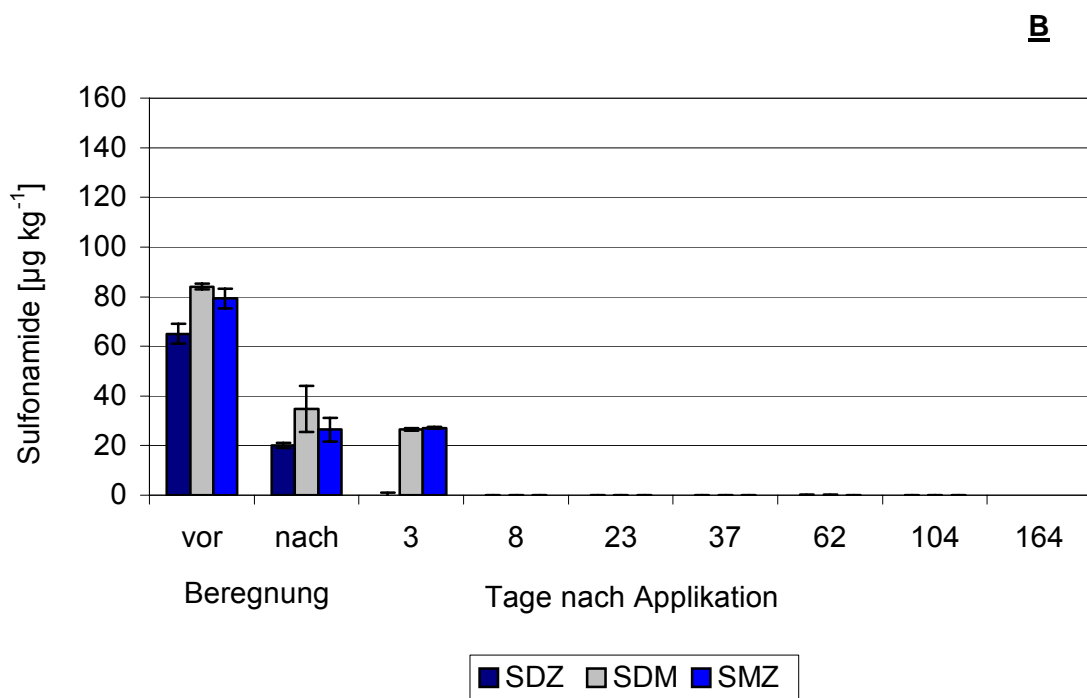
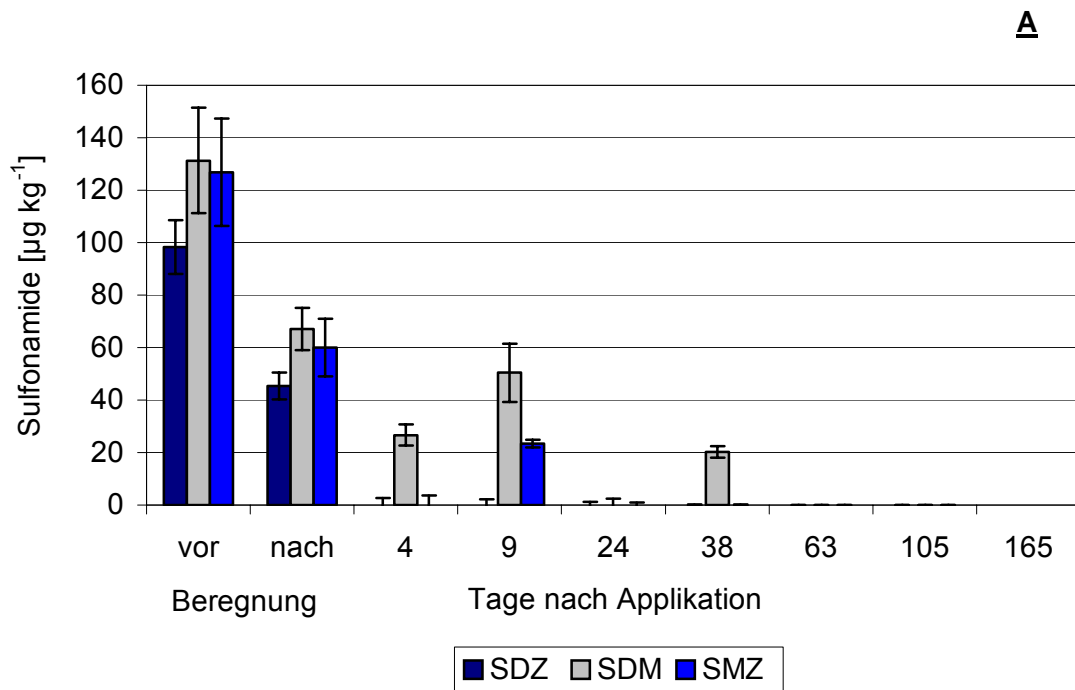
Das für die Sulfonamide Sulfadiazin und Sulfamethoxazol in Labortestsystemen ermittelte Abbauverhalten spiegelte sich auch in der Testplot-Experimenten wider, in denen diese Testsubstanzen zusammen mit Sulfadimidin insbesondere in Serie 1 in gegenüber der Praxis auftretenden deutlich überhöhten Konzentrationen appliziert wurden. Die in Serie 1 nach Testgülle-Applikation, Bodenbearbeitung und Intensivberegnung resultierende Rückstandssituation ist in **Abb. 4.16** illustriert. In den Untersuchungen zum Abbauverhalten dieser Testsubstanzen in schluffigem Ton konnte unter Freilandbedingungen jeweils eine schnellere Konzentrationsabnahme festgestellt werden. Aus-

gehend von einer durchschnittlichen Sulfonamid-Konzentration von  $2430 \mu\text{g kg}^{-1}$  in der 0-15 cm-Bodenschicht unmittelbar nach der Beregnung sank diese bereits innerhalb von 4 Tagen auf  $662 \mu\text{g Sulfonamid kg}^{-1}$  Boden. Nach 14 Tagen konnte eine durchschnittliche Sulfonamid-Konzentration von  $552 \mu\text{g kg}^{-1}$  ermittelt werden. Bereits 28 Tage nach Untersuchungsbeginn waren keine Sulfonamid-Rückstände oberhalb der Bestimmungsgrenze mehr in den entnommenen Proben nachweisbar. Der anfängliche Konzentrationsanstieg vom Zeitpunkt vor der Beregnung bis nach der Beregnung könnte dabei auf eine ungleichmäßige Verteilung der Testgülle durch den Grubbereinsatz unmittelbar nach der Applikation zurückzuführen sein. Diese Annahme scheint die Rückstandsuntersuchung des Grünlandplots zu belegen, bei dem die Sulfonamid-Konzentrationen nach Testgülle-Applikation und sich unmittelbar anschließender Intensivberegnung schnell abnahmen (**Abb. 4.17**). Bei Ausgangskonzentrationen  $> 6000 \mu\text{g Sulfonamid kg}^{-1}$  Boden sanken diese Werte innerhalb von 3 Tagen auf durchschnittlich  $175 \mu\text{g Sulfonamid kg}^{-1}$  Boden, die dann bis zum Versuchsende nach 101 Tagen annähernd konstant blieben.



**Abb. 4.17: Sulfonamid-Konzentrationen in der 0-5 cm-Bodenschicht im Grünlandboden (AD-G) in Serie 1 nach Testgülle-Applikation und unmittelbar anschließender Intensivberegnung**





**Abb. 4.18: Sulfonamid-Konzentrationen in der 0-15 cm-Bodenschicht von A: Plot 1 und B: Plot 2 der Ackerfläche (AD-A) in Serie 2 nach Testgülle-Applikation, Einarbeitung und Intensivberegnung**

Für die 3 strukturanaloge Sulfonamide zeichneten sich bezüglich der Rückstandssi-

tuation im Boden keine eindeutigen substanzspezifischen Unterschiede ab. Es ist hier eher davon auszugehen, dass die auftretenden Variabilitäten auf den amphoteren Charakter der Sulfonamide zurückzuführen sind, der im Rahmen der analytischen Methode durch die Einstellung des pH-Wertes der Analysenlösungen nur bedingt berücksichtigt werden konnte (Langhammer, 1989, Pietsch et al., 1999, Haller et al., 2002, Höltge, 2005). Aus den in Serie 2 parallel durchgeführten Testplot-Experimenten läßt sich ferner die unter Freilandbedingungen auftretenden Variabilitäten abschätzen (**Abb. 4.18**). Während für Plot 1 ausgehend von dem höheren Konzentrationsniveau Sulfonamid-Rückstände bis zur Tag-38–Probe oberhalb der Bestimmungsgrenze von 20 µg Sulfonamid kg<sup>-1</sup> Boden detektierbar waren, war dieses in der Tag-8–Probe von Plot 2 bereits nicht mehr möglich. Eine ähnliche Rückstandssituation zeichnete sich auch für die Akker- und Grünlandplots in Serie 3 ab (Höltge, 2005).

Unter Freilandbedingungen unterlagen danach die Sulfonamide in güllegedüngtem Boden einer raschen Konzentrationsabnahme. Diese ist insbesondere auf der Grünlandfläche zumindest teilweise auf Runoff-Austräge zurückzuführen (s. Kap. 5). Wie aus den Labortests abzuleiten ist, spielen zusätzlich Abbauprozesse, aus denen nicht nur Umwandlungsprodukte, sondern unter dem Einfluss der Testgülle-Applikation auch nicht-extrahierbare Rückstände hervorgehen, eine wesentliche Rolle. Auf die Verlagerung der applizierten Testsubstanzen in tiefere Bodenschichten mit dem perkolierenden Beregnungswasser geben die durchgeführten Labor- und Freilandtests dagegen keinen Hinweis (Kreuzig und Höltge, 2005, Höltge, 2005; s. auch Kap. 4.4). Insgesamt wird mit dieser Freilandstudie das unter Einsatz verschiedener Labortestsysteme ermittelte Abbauverhalten der Sulfonamide belegt.

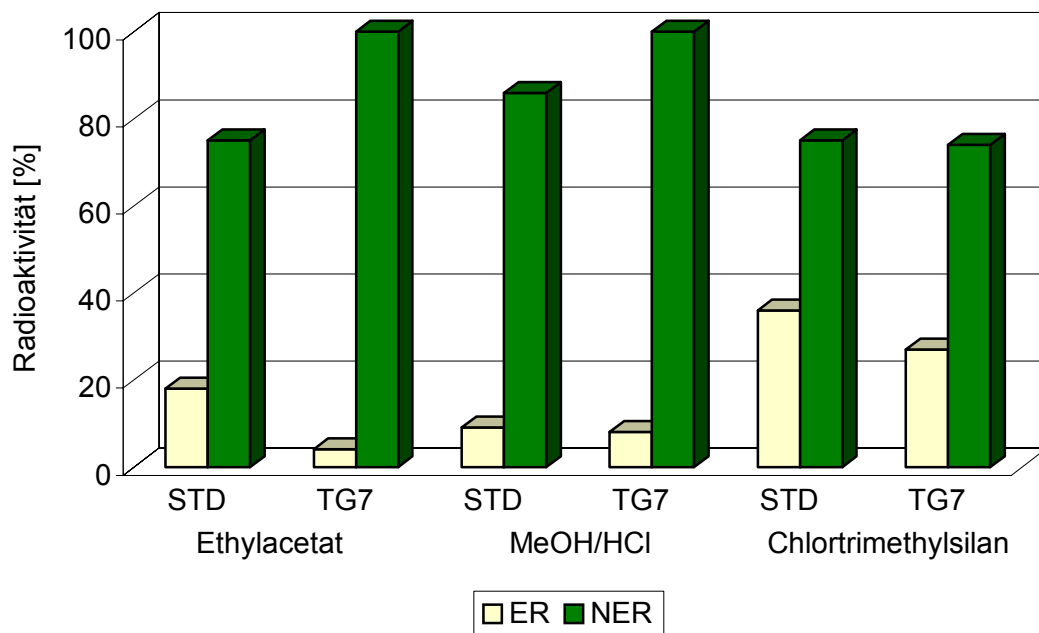
### **Chemische und biologische Charakterisierung nicht-extrahierbarer Rückstände**

Die Rückstandsdynamik von Sulfonamiden in Böden wird neben sehr niedrigen Mineralisationsraten ganz wesentlich durch die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände bestimmt (Kreuzig et al., 2003, 2005 a). Insbesondere nach der Applikation von Testgülle zeigen diese Substanzen eine hohe Affinität zu physiko-chemisch unterschiedlichen Bodenmatrizes. Wie in Labortestsystemen gezeigt werden konnte, ist dabei diese rasche Festlegung zumindest teilweise eine Funktion der mikrobiellen Bodenaktivität (Kreuzig und Höltge, 2005). Als nicht-extrahierbare Rückstände gemäß der IUPAC-Definition werden die Rückstände von Chemikalien in Bodenproben angesehen, die

durch eine Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel nicht ohne signifikante Veränderung ihrer chemischen Natur aus der Bodenmatrix freigesetzt werden (Roberts, 1984, Agnihotri und Borooah, 1994, Gevaio et al., 2000). Basierend auf dieser Definition gibt es für in der Matrix gülleredüngter Böden festgelegte Veterinärpharmaka unterschiedliche Ansätze der Bewertung ihrer Umweltrelevanz. Die nicht erschöpfende Extrahierbarkeit mit einem organischen Lösungsmittel, das die Extraktionseffizienz der Bodenlösung für organische, teilweise nur bedingt wasserlösliche Chemikalien um ein Vielfaches übersteigt, könnte als ein deutlicher Hinweis einer irreversibel verminderten Bioverfügbarkeit interpretiert werden. Damit läge ein ähnlich effizienter Eliminationsprozess vor, wie er durch die Bildung von nicht biologisch wirksamen Metaboliten oder wie die durch Mineralisation erfolgende Umwandlung in Kohlendioxid und Wasser dargestellt wird. In diesem Zusammenhang sind allerdings die umweltrelevanten Fragen nach der langfristigen Pufferkapazität des Bodensystems und einer möglichen Remobilisierung unter veränderten Milieubedingungen zu stellen. Im mehrstufigen Prüfkonzept der Pflanzenschutzmittel-Zulassung werden die nicht-extrahierbaren Rückstände der Pflanzenschutzmittel aufgrund ihrer nur in den seltensten Fällen bekannten chemischen Natur und ihrer ökotoxikologischen Wirkung in die Beurteilung der Persistenz einbezogen. Die wie folgt definierten Persistenzkriterien, Mineralisation < 5 % und Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände > 70 % in 100 Tagen unter Laborbedingungen, können damit gemäß der in diesem Zulassungsverfahren angewendeten Nutzen/Risiko-Bewertung ein Ausschlusskriterium darstellen.

In Anbetracht der Spannweite dieser möglichen Interpretationsansätze wurden deswegen im Runoff-Projekt erste Tests zur Charakterisierung der aus den Batchtests vorliegenden nicht-extrahierbaren <sup>14</sup>C-Sulfonamid-Rückstände in Bodenproben durchgeführt. Die chemische Charakterisierung basierte dabei auf einer sequentiellen Extraktionstechnik, deren Effizienz für die Behandlung von nach Standard- und Testgülle-Applikation erhaltenen <sup>14</sup>C-Sulfadiazin-Rückständen in **Abb. 4.19** dargestellt ist. In allen Ansätzen konnte die Extraktionseffizienz von Ethylacetat geringfügig durch die reaktive Behandlung mit salzsaurem Methanol gesteigert werden. Der sich anschließende Einsatz von Chlortrimethylsilan führte zu einer Derivatisierung funktioneller Gruppen der Bodenmatrix, aus der eine weitere Freisetzung von <sup>14</sup>C-Sulfadiazin-Rückständen resultierte, in denen <sup>14</sup>C-Sulfadiazin als unveränderte Ausgangsverbindung bis zu einem Anteil von 3 % vorlag. Damit entzogen sich durchschnittlich 75 % der nach 7-tägiger Inkubation in der Bodenmatrix festgelegten Rückstände einer extraktiven Frei-

setzung. Entsprechend den Untersuchungen von Klaus et al. (1998) zum Rückstandsverhalten des Triazin-Fungizides Anilazin in Sedimenten ist davon auszugehen, dass auch hier die nicht durch die Silylierungsreaktion freigesetzten Rückstände kovalent an die Bodenmatrix gebunden vorliegen. Insgesamt wird durch diese Tests die hohe Affinität der  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin-Rückstände zur Bodenmatrix deutlich betont.

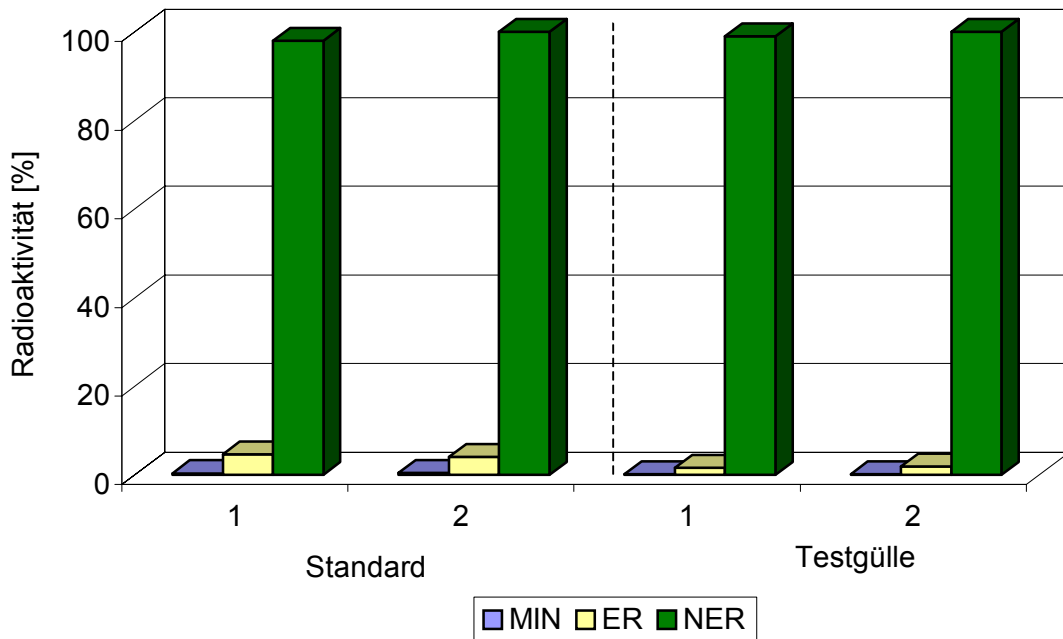


**STD:** Standard-Applikation, **TG7:** Testgülle-Applikation mit 7 Tage gealterten Rückständen, **MeOH/HCl:** salzsaures Methanol

**Abb. 4.19: Effizienz der sequentiellen Extraktionstechnik zur Behandlung nicht-extrahierbarer  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin-Rückstände in schluffigem Tonboden**

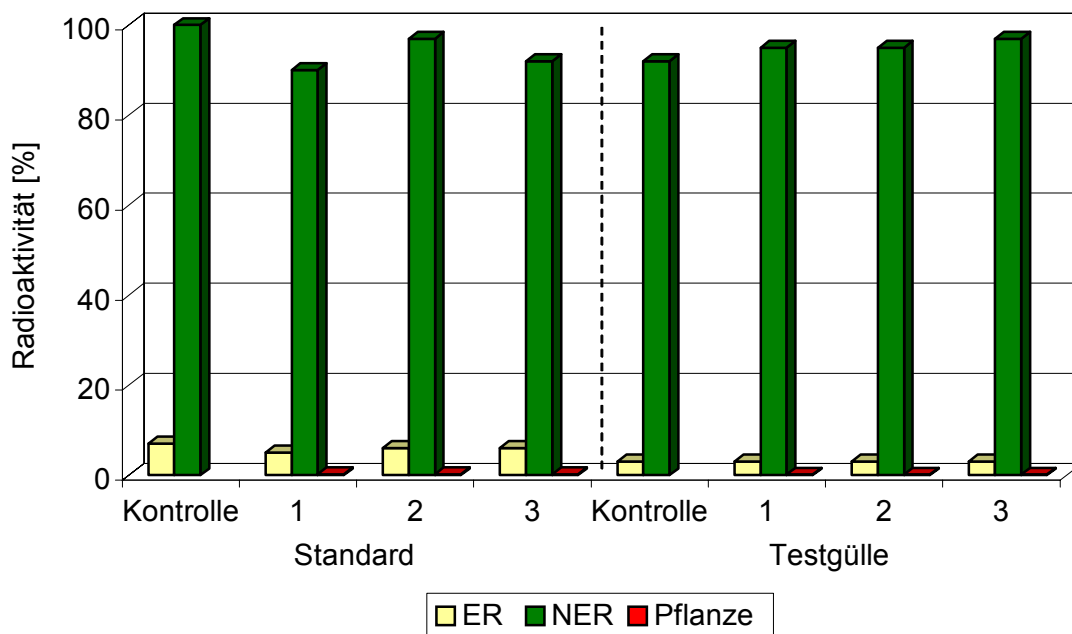
Unter dem Gesichtspunkt der Remobilisierung nicht-extrahierbarer  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin- bzw.  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol-Rückstände in schluffigem Tonboden unter veränderten Milieubedingungen wurden auch verschiedene biologische Tests durchgeführt (Heise et al., 2006). So wurden im Belebtschlamm- und im *Brassica rapa*-Test die nach Ethylacetat-Behandlung vorliegenden Extraktionsrückstände aus den Batchtests mit  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin eingesetzt. Aber auch die Erhöhung der mikrobiellen Aktivität sowie die Ausscheidung von Pflanzenexudaten zusammen mit jeweils einer weiteren Ethylacetat-

Extraktion führte nur zu einer geringfügigen Radioaktivitätsfreisetzung (**Abb. 4.20**), die auch im Pflanzentest gegenüber der Kontrolle nur eine geringfügige Pflanzenaufnahme bedingt (**Abb. 4.21**).



**Abb. 4.20: Belebtschlammtest über 28 Tage zur Remobilisierung nicht-extrahierbarer  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin-Rückstände in schluffigem Tonboden**

Für die Charakterisierung der nicht-extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol-Rückstände in schluffigem Tonboden fanden 2 Wurmtests Anwendung. Im *Lumbricus terrestris*-Test A wurde der Effekt der Bioturbation auf die Radioaktivitätsfreisetzung aus den eingesetzten Extraktionsrückständen untersucht. Insgesamt ist diese Freisetzung und damit verbunden die Aufnahme durch die Regenwürmer als gering zu bezeichnen, was in den Aktivitätskonzentrationen in den nach Versuchsende analysierten Boden- und Wurmproben belegt wird (**Abb. 4.22**). Im Einklang mit der chemischen Charakterisierung der Bindungsstärke belegen die durchgeführten Remobilisierungstests einheitlich die hohe Affinität von Sulfonamid-Rückständen zur Bodenmatrix. Wie aus allen Tests abzulesen ist, fällt die Freisetzung in der Matrix festgelegter Sulfonamid-Rückstände nach Testgülle-Applikation geringer als nach Standard-Applikation aus, wodurch der Einfluss des realen Eintragspfades auf die Rückstandsdynamik von Veterinärpharmaka betont wird.



**Abb. 4.21: *Brassica rapa*-Test über 14 Tage zur Remobilisierung nicht-extrahierbarer  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin-Rückstände in schluffigem Tonboden**

Dieser Aspekt wird im *Lumbricus terrestris*-Test B bekräftigt. Da für die untersuchten Sulfonamide unmittelbar nach Applikation eine weitgehend spontane Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände erfolgt, war in diesem Test von Interesse, inwiefern die Festlegung von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol-Rückständen durch die Bodenaufnahme der Regenwürmer zu beeinflussen ist. Insgesamt zeigen sich in diesen 14-tägigen Tests nur geringfügige Einflüsse (**Abb. 4.23**). Die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände stellt hier den wesentlichen konzentrationsbestimmenden Prozess dar. Allerdings fallen auch hier die Unterschiede zwischen der Standard- und der Testgülle-Applikation deutlich auf. So korrespondieren nach Standard-Applikation höhere Anteile der extrahierbaren Fraktion mit höheren Gehalten an  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol-Rückständen in den Regenwürmern. Die Güllematrix steigert dagegen die Immobilisierung. Die chemische und biologische Charakterisierung basiert bisher auf Kurzzeittests, die im Einklang eine hohe Bindungsstärke der Sulfonamid-Rückstände zur Bodenmatrix und nur geringe Tendenzen einer Remobilisierung wiedergeben. Von Interesse wären hier ergänzende Langzeittests unter Labor- sowie und Freilandbedingungen, um die Bewertung der Umweltrelevanz dieser nicht-extrahierbaren Rückstände zu vervollständigen.

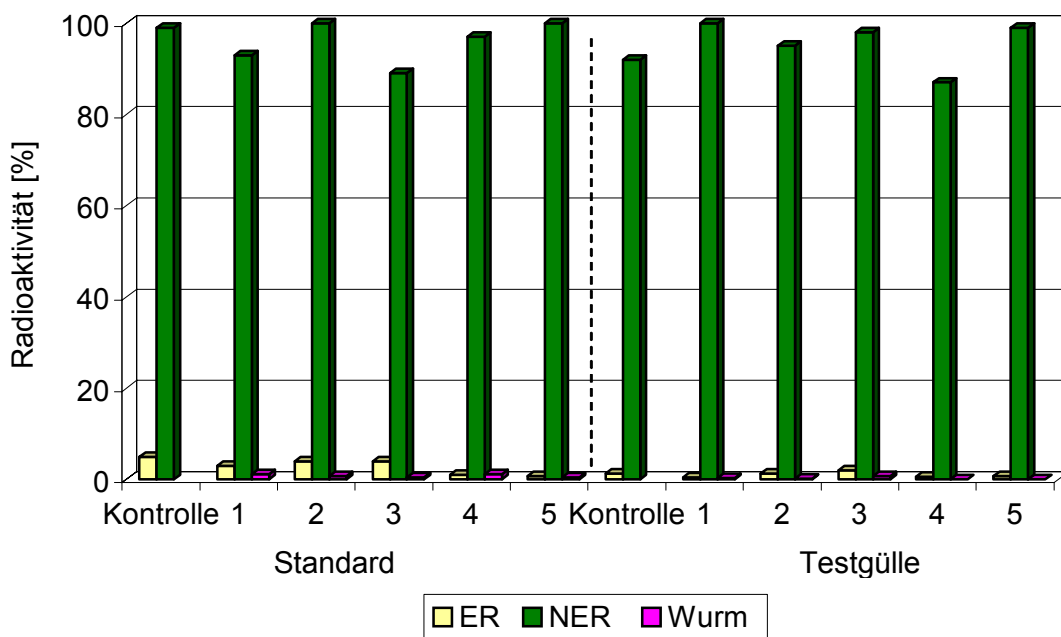


Abb. 4.22: *Lumbricus terrestris*-Test A zur Remobilisierung nicht-extrahierbarer  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol-Rückstände in schluffigem Tonboden

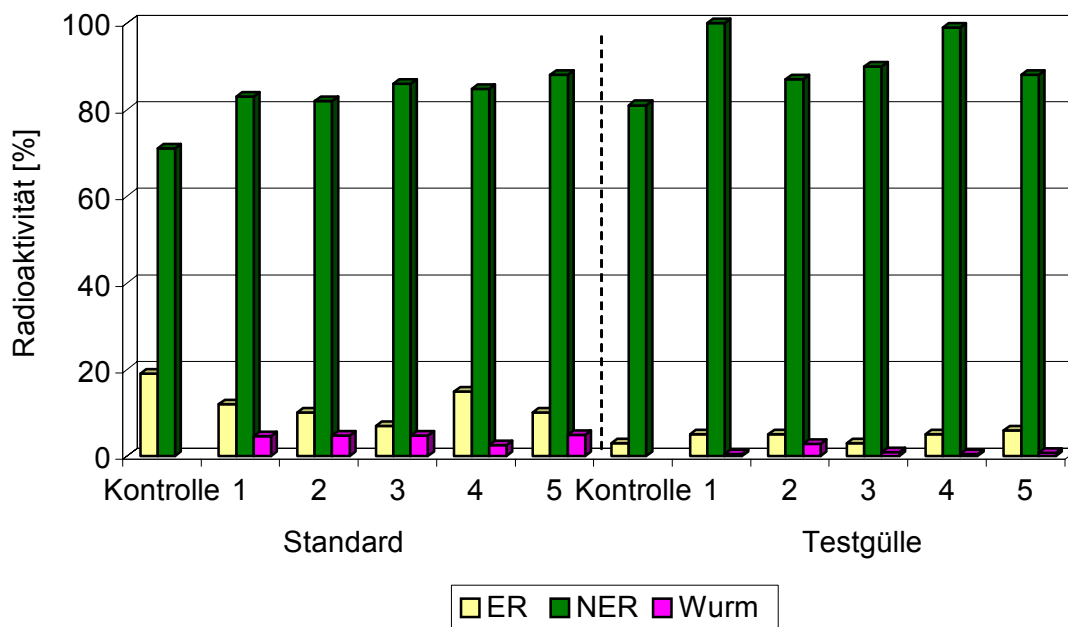


Abb. 4.23: *Lumbricus terrestris*-Test B zur Immobilisierung von  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol in schluffigem Tonboden nach Standard- und Testgülle-Applikation

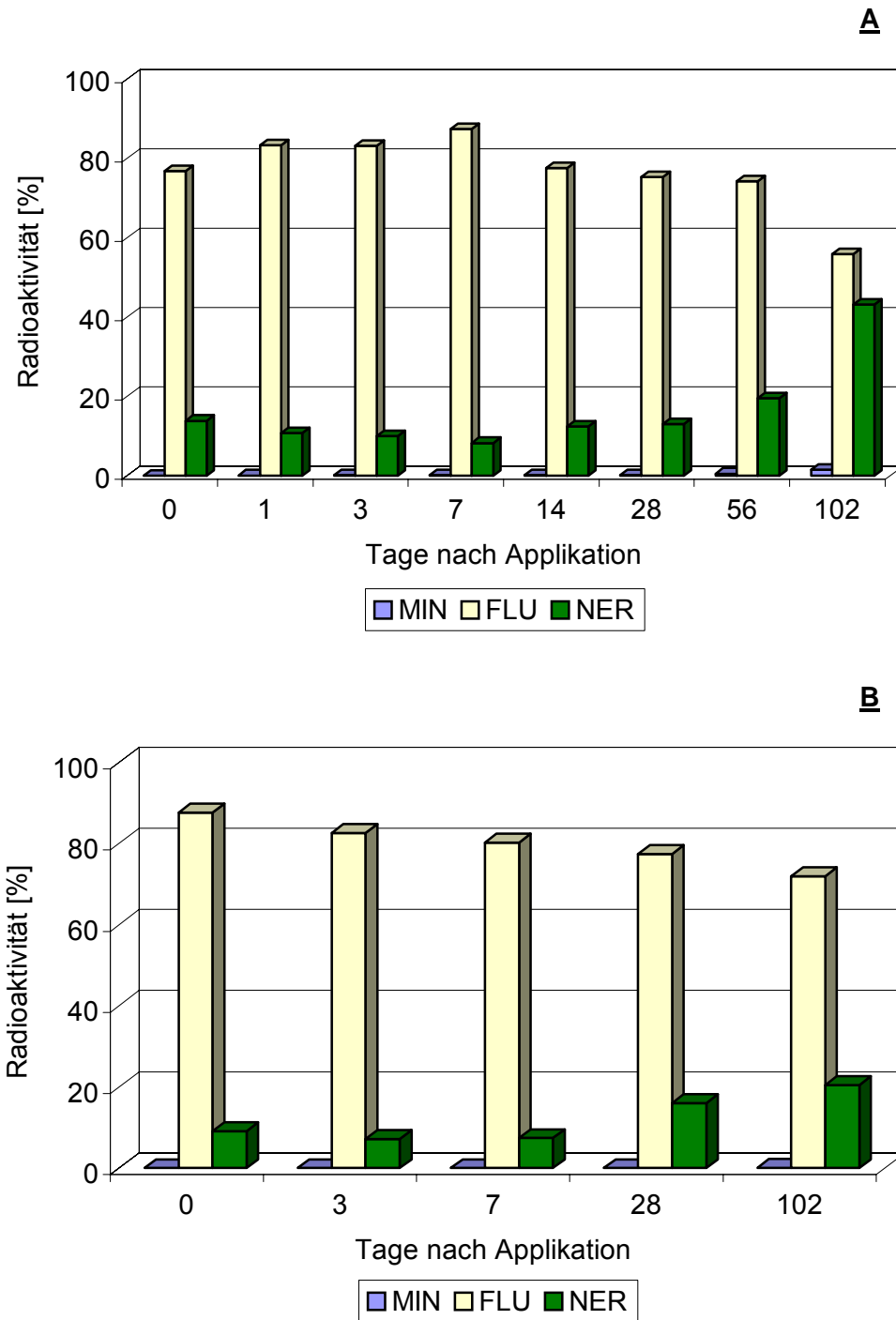
### 4.3.2 Benzimidazole

#### Langzeittests zum mikrobiellen Abbau

Im Gegensatz zu den untersuchten Sulfonamiden wurde die Rückstandsdynamik der Benzimidazole in den 102-tägigen Labortests zum mikrobiellen Abbau in schluffigem Ton und schluffigem Sand wesentlich durch das Auftreten extrahierbarer Rückstände bestimmt. Besonders deutlich fiel dieser Unterschied nach Standard-Applikation auf. Am Versuchsende konnten für  $^{14}\text{C}$ -Flubendazol im Tonboden 53 % extrahierbare und 44 % nicht-extrahierbare Rückstände gemessen werden. Die Mineralisation von 1.7 % war von untergeordneter Bedeutung. Aufgrund der geringeren mikrobiellen Aktivität des schluffigen Sandbodens betrug die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände nur 21 % und die  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid-Freisetzung nur 0.1 % der anfangs applizierten Radioaktivität (**Abb. 4.24**). Im Metaboliten-Screening konnte in den Ethylacetat-Extrakten ausschließlich die applizierte Ausgangsverbindung detektiert werden. Für  $^{14}\text{C}$ -Flubendazol ließ sich aus den ermittelten Daten damit im schluffigen Ton ein  $\text{DT}_{50}$ -Wert von 174 Tagen berechnen (Timme et al., 1986). Im schluffigen Sand nahmen dagegen die Flubendazol-Konzentrationen so langsam ab, dass aufgrund der 102-tägigen Abbautests kein zuverlässiger Wert abgeleitet werden konnte.

Gegenüber Flubendazol fiel in den Abbautests mit  $^{14}\text{C}$ -Fenbendazol in beiden untersuchten Böden die schnellere Abnahme der extrahierbaren Anteile auf. Wie das Metaboliten-Screening belegte, nahm die Konzentration der unveränderten Ausgangsverbindung kontinuierlich ab (**Abb. 4.25**). In den Tag-102-Proben konnte die Ausgangsverbindung dann mit Anteilen von 44 % im Tonboden gegenüber 56 % im mikrobiell weniger aktiven Sandboden nachgewiesen werden. Aus der Konzentrationsabnahme von durchschnittlich  $186 \mu\text{g Fenbendazol kg}^{-1}$  Boden auf 87 bzw.  $112 \mu\text{g kg}^{-1}$  Boden resultierten  $\text{DT}_{50}$ -Werte von 54 bzw. 186 Tagen. Hiermit ging ein kontinuierlicher Anstieg des primär gebildeten Metaboliten Oxfendazol (OX-FEN) einher (Petersen et al., 2000, Capece und Pérez, 1999), auf den zum Versuchsende 16 bzw. 20 % der anfangs applizierten Radioaktivität entfielen (Höltge, 2005). Während in beiden Böden die Mineralisation von 1 bzw. 0.3 % von untergeordneter Bedeutung für die Konzentrationsabnahme war, entfielen auf die nicht-extrahierbaren Rückstände 36 % im Tonboden und 28 % im Sandboden. Bereits dieser Vergleich der Rückstandsdaten beider strukturanalogen Benzimidazole gibt Aufschlüsse, die später auch für die Interpretation des Rückstandsverhaltens unter Freilandbedingungen von Bedeutung sind.





**Abb. 4.24: Mikrobieller Abbau von <sup>14</sup>C-Flubendazol (FLU) A: im schluffigen Ton (AD-A) und B: im schluffigen Sand (NW) nach Standard-Applikation**

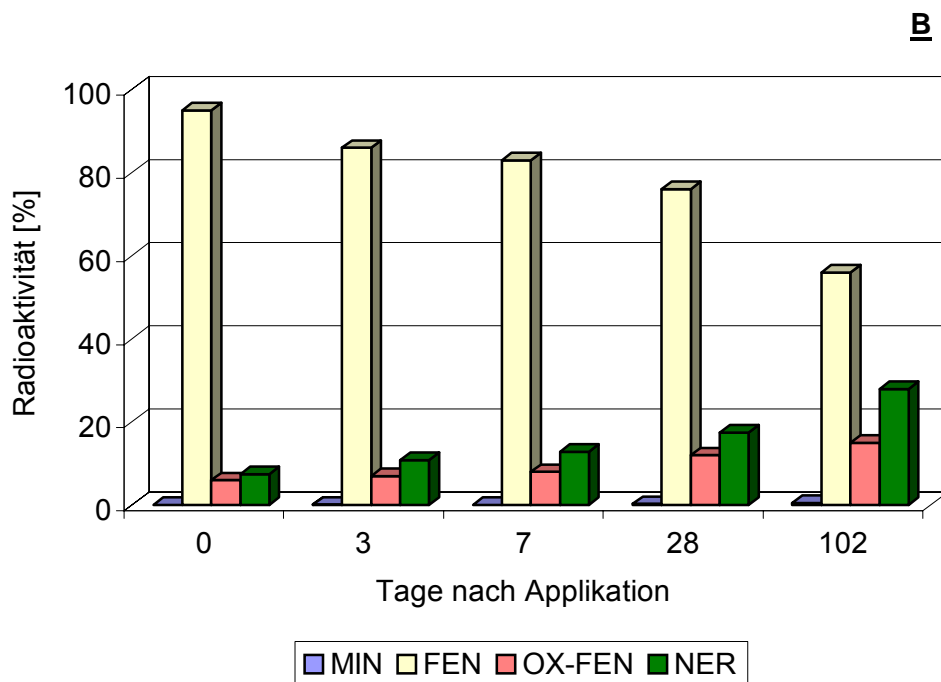
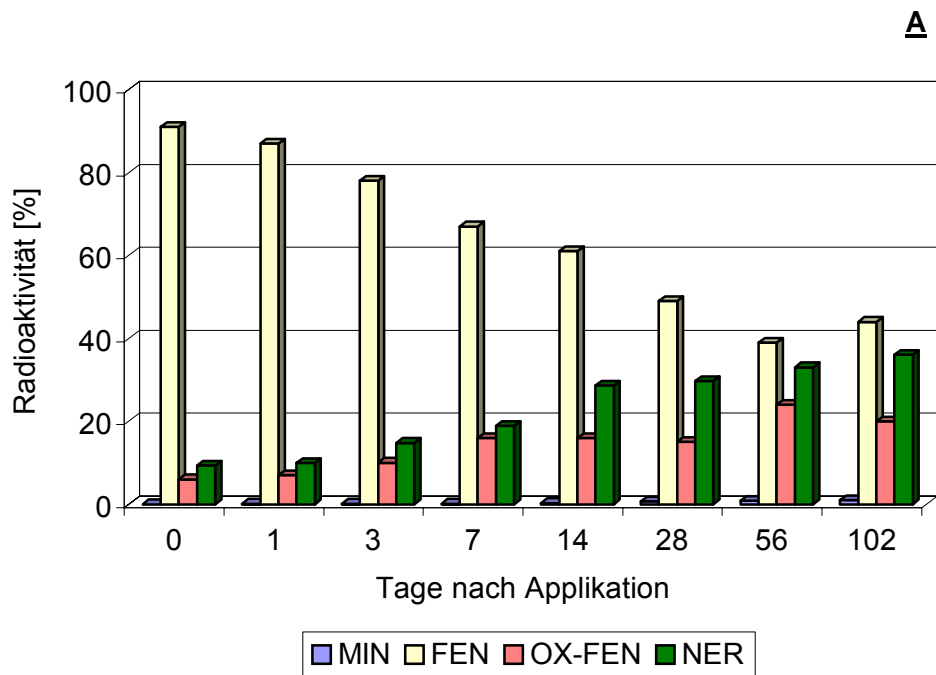


Abb. 4.25: Mikrobieller Abbau von <sup>14</sup>C-Fenbendazol (FEN) A: im schluffigen Ton (AD- A) und B: im schluffigen Sand (NW) nach Standard-Applikation unter Berücksichtigung der Metaboliten-Bildung (OX-FEN: Oxfendazol)

Auch für die untersuchten Benzimidazole führte die Testgülle-Applikation zu Veränderungen in der Rückstandsdynamik, die durch einen Transfer der Rückstände von der extrahierbaren in die nicht-extrahierbare Fraktion gekennzeichnet waren. So waren für  $^{14}\text{C}$ -Flubendazol unmittelbar nach der Testgülle-Applikation in schluffigen Ton 80 % der anfangs applizierten Radioaktivität mit Ethylacetat extrahierbar. Dieser Anteil reduzierte sich in 102 Tagen auf 45 %, während die nicht-extrahierbaren Rückstände von 24 auf 46 % anstiegen (**Abb. 4.26**). Auch in der Matrix der schluffigen Sandproben erfolgte unter dem Einfluß der Testgülle eine verstärkte Festlegung der  $^{14}\text{C}$ -Flubendazol-Rückstände, so daß hier die Rückstandssituation von der Tag-7-Probe an von der nicht-extrahierbaren Fraktion deutlich beeinflusst wurde. Die Mineralisation spielte mit 0.5 % in beiden Böden keine bedeutende Rolle. In den Ethylacetat-Extrakten der untersuchten Bodenproben konnte mittels Metaboliten-Screening wiederum nur  $^{14}\text{C}$ -Flubendazol als unveränderte Ausgangsverbindung detektiert werden. Im schluffigen Tonboden errechnete sich so ein  $\text{DT}_{50}$ -Wert von 185 Tagen, während sich im schluffigen Sand aufgrund der Variation der Meßwerte und der kleineren Probenzahl kein zuverlässiger Wert ergab (Timme et al., 1986).

Für  $^{14}\text{C}$ -Fenbendazol wurde die Rückstandsdynamik besonders im Tonboden durch die Testgülle intensiviert (**Abb. 4.27**). So traten unmittelbar nach der Applikation bereits 31 % nicht-extrahierbare Rückstände auf, die bis zum Versuchsende auf 52 % anstiegen. Der Fenbendazol-Anteil sank innerhalb von 102 Tagen kontinuierlich von 61 auf 12 %, woraus sich ein  $\text{DT}_{50}$ -Wert von 9 Tagen berechnete (Timme et al., 1986). Die Konzentrationsabnahme der applizierten Ausgangsverbindung ging anfangs mit einem kontinuierlichen Anstieg des primären Metaboliten Oxfendazol einher. In der Tag-14-Probe erreichte dieser einen Anteil von 43 %, um dann zum Versuchsende auf 22 % abzufallen. In diesem Zeitfenster stieg die Konzentration des sekundären Metaboliten Fenbendazolsulfon an, der aus der Oxidation von Oxfendazol hervorgeht (Fletouris et al., 1996). Nach 102 Tagen erreichte die Mineralisation 2 %. Im schluffigen Sand machte sich die Intensivierung der rückstandsdynamischen Prozesse nach Testgülle-Applikation weniger stark bemerkbar. Auch hier wurde eine Abnahme der  $^{14}\text{C}$ -Fenbendazol-Anteile von 77 auf 22 % konstatiert, aus dem ein  $\text{DT}_{50}$ -Wert von 55 Tagen resultierte. Diese Konzentrationsabnahme war allerdings weniger auf die Metaboliten-Bildung zurückzuführen. Zwar konnte wiederum Oxfendazol nachgewiesen werden, doch folgte bis zum Versuchsende keine Umwandlung zu Fenbendazolsulfon. Dafür stiegen hier die nicht-extrahierbaren Rückstände auf 62 % an. Auf die Minerali-

sation entfielen 0.7 %.

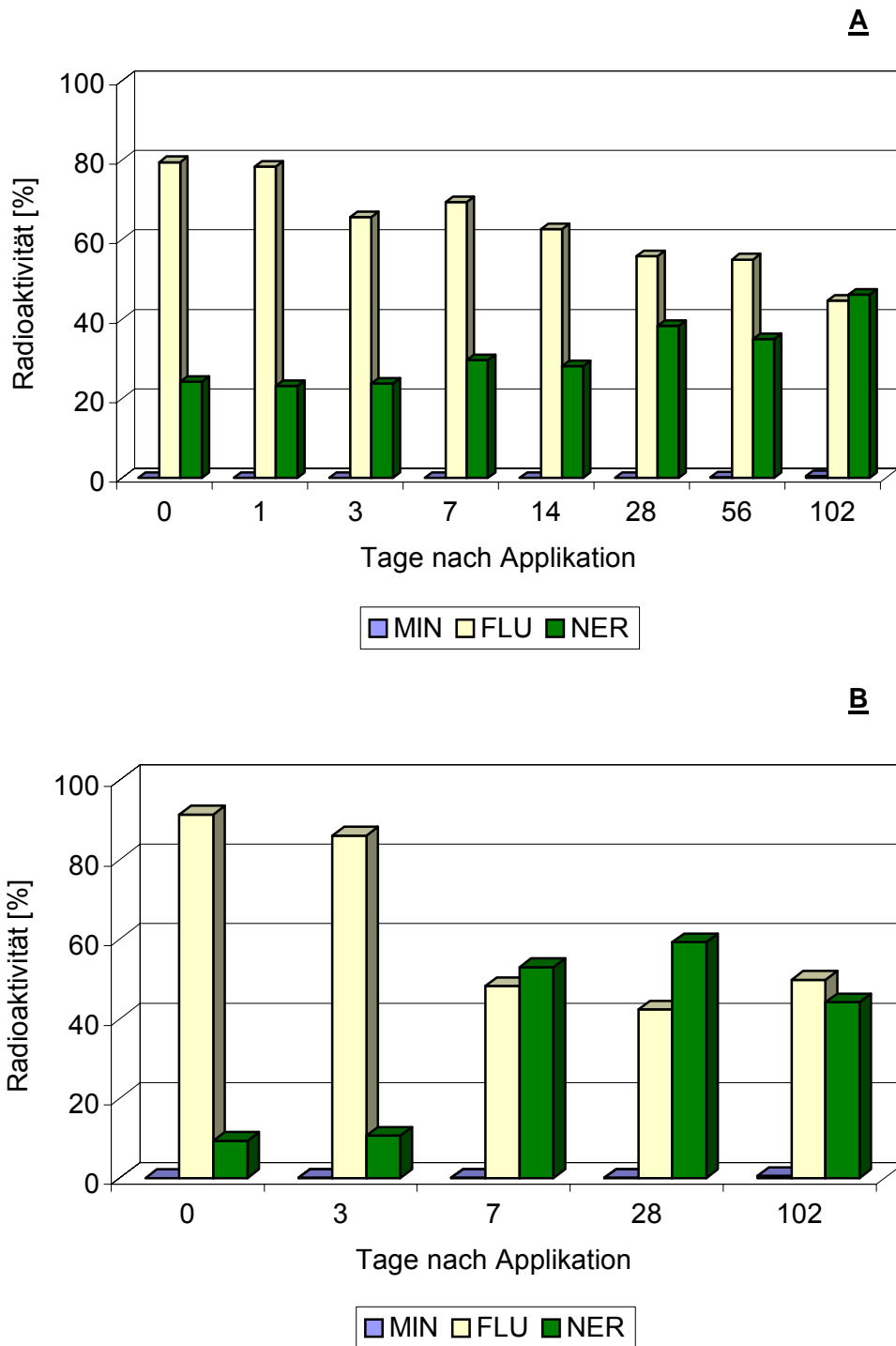


Abb. 4.26: Mikrobieller Abbau von  $^{14}\text{C}$ -Flubendazol (FLU) **A**: im schluffigen Ton (AD-A) und **B**: im schluffigen Sand (NW) nach Testgülle-Applikation

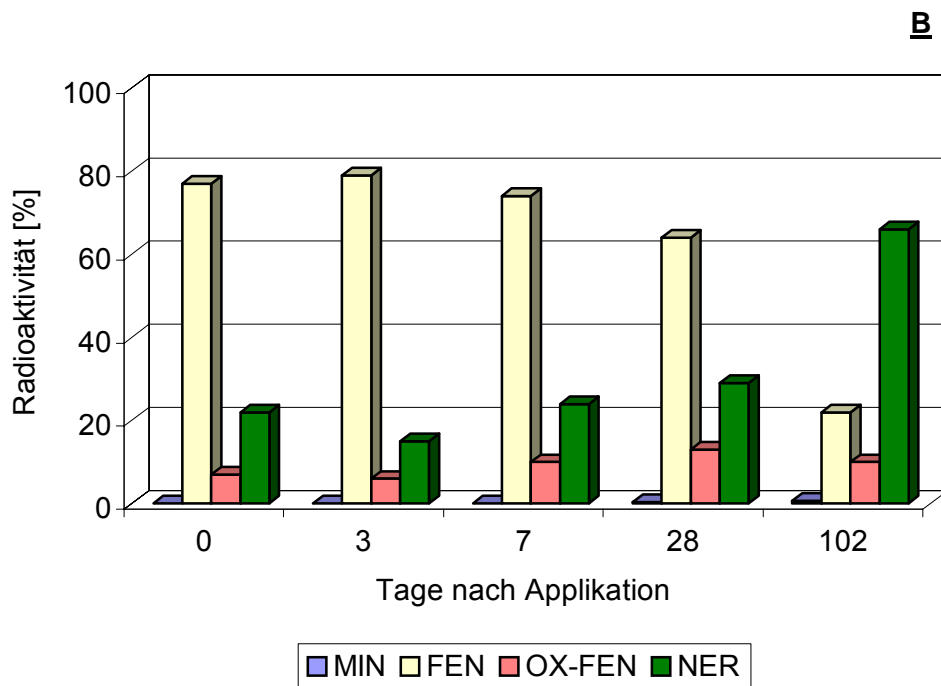
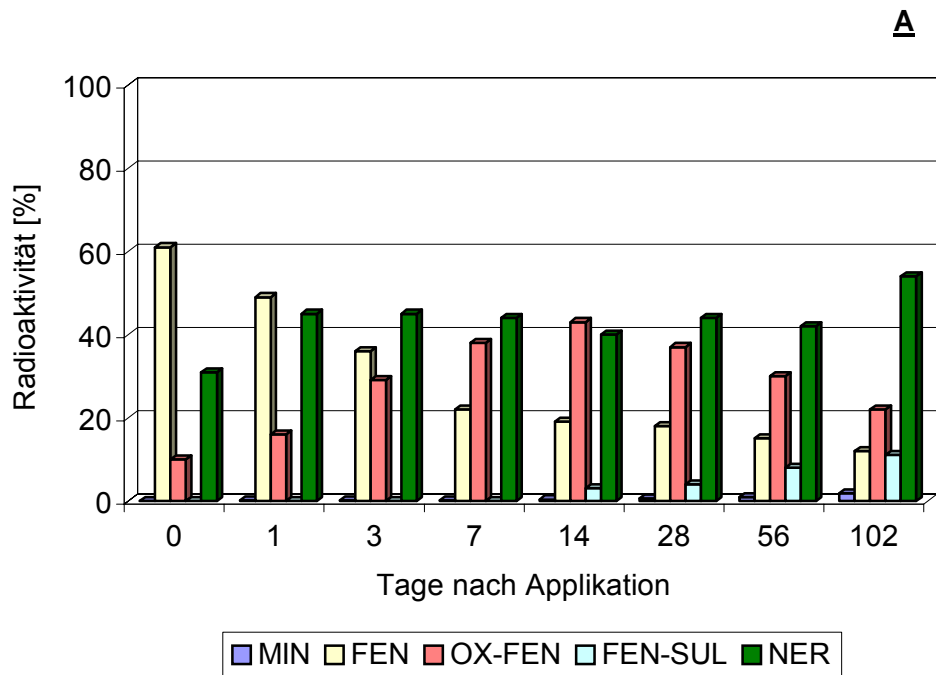


Abb. 4.27: Mikrobieller Abbau von  $^{14}\text{C}$ -Fenbendazol (FEN) A: im schluffigen Ton (AD-A) und B: im schluffigen Sand (NW) nach Testgulle-Applikation unter Berucksichtigung der Metaboliten-Bildung (OX-FEN: Oxfendazol, FEN-SUL: Fenbendazolsulfon)

Als Maßnahme der Qualitätssicherung wurden neben der Aufstellung der Bilanzen Batchtests unterschiedlicher Inkubationsintervalle in Doppelbestimmung durchgeführt. Die für <sup>14</sup>C-Fenbendazol in schluffigem Tonboden nach Standard- und Testgülle-Applikation erzielten Resultate sind in **Tab. 4.5** aufgelistet, aus der die Reproduzierbarkeit der einzelnen Ansätze ersichtlich wird. Weitere Daten zur Qualitätssicherung sind bei Höltge (2005) aufgeführt.

**Tab 4.5: Radioaktivitätsbilanzen in den Laborbatchexperimenten zum mikrobiellen Abbau von <sup>14</sup>C-Fenbendazol in schluffigem Ton nach Standard- und Testgülle-Applikation**

<b>Batchtests</b>	<b>3/a</b>	<b>3/b</b>	<b>28/a</b>	<b>28/b</b>	<b>102/a</b>	<b>102/b</b>
<b>Standard</b>						
MIN [%]	0.2	0.2	0.7	0.7	1	1
ER [%]	88	83	64	64	64	61
NER [%]	15	12	30	32	36	38
Bilanz [%]	103	95	95	97	101	100
<b>Testgülle</b>						
MIN [%]	0.1	0.2	0.5	0.6	2	2
ER [%]	64	67	59	59	46	45
NER [%]	45	32	44	46	54	55
Bilanz [%]	109	99	104	106	102	102

Im Zusammenhang mit der Bewertung nicht-extrahierbarer Benzimidazol-Rückstände in Böden waren auch Tests zur Effizienz des Extraktionsmittels Ethylacetat von Interesse. So wurden die Tag-102-Proben aus den jeweiligen Batchtests einer Nachbehandlung mit salzsaurem Methanol unterzogen, um anhand dieser sequentiellen Extraktionstechnik auch Hinweise auf die Bindungsstärke der Rückstände an die Bodenmatrix zu gewinnen. Für <sup>14</sup>C-Flubendazol ergab sich so für die einzelnen Batchtests eine Steigerung der Extraktionseffizienz von 10-29 %. Eine entsprechende Effizienzsteigerung ließ sich ebenfalls durch eine Nachextraktion mit Dimethylsulfoxid erzielen. In Ergänzung zur Bodenanalytik ist in **Tab. 4.6** die entsprechende Bilanz für die sequentielle Extraktion der Gülleproben aufgeführt. Bei der Nachextraktion wurden hier noch 19 % aus der Ethylacetat-Behandlung hervorgehenden Extraktionsrückständen

freigesetzt, so dass im Vergleich zur Bodenextraktion auf ähnliche Bindungsstärken der <sup>14</sup>C-Flubendazol-Rückstände in den Gülle- sowie in Bodenmatrizes geschlossen werden kann. Im Gegensatz hierzu stehen die Werte für <sup>14</sup>C-Sulfadiazin (Kreuzig und Höltge, 2005). Während 32 % der nach Ethylacetat-Behandlung in der Rindergülle-Matrix verbliebenen Radioaktivität mittels Nachextraktion freigesetzt werden konnten, betrug dieser Wert bei güllegedüngten Bodenproben nur 3 %. Hieraus ließ sich die hohe Affinität der <sup>14</sup>C-Sulfadiazin-Rückstände zur Tonboden-Matrix ablesen.

**Tab. 4.6: Bilanzierung der Tests zur mikrobiellen Abbaubarkeit von <sup>14</sup>C-Flubendazol in Böden nach 102-tägiger Inkubation unter Berücksichtigung der Nachextraktion mit salzsaurem Methanol bzw. Dimethylsulfoxid**

<b>Probenmatrix Applikationstechnik</b>	<b>SG STD</b>	<b>AD-A STD</b>	<b>AD-A STD</b>	<b>AD-A TG</b>	<b>NW STD</b>	<b>NW TG</b>
MIN [%]	0.04	2	2	1	0.1	1
ER <sub>Etac</sub> [%]	72	53	53	45	72	50
ER <sub>MeOH/HCl</sub> [%]	19	12	---	17	10	29
ER <sub>DMSO</sub> [%]	---	---	18	---	---	---
NER [%]	3	34	19	25	11	18
Bilanz [%]	94	100	87	87	93	97

**AD-A:** schluffiger Ton (Ackerfläche), **NW:** schluffiger Sand, **SG:** Schweinegülle, **STD:** Standard-Applikation, **TG:** Testgülle-Applikation, **MIN:** Mineralisation, **ER<sub>Etac</sub>:** extrahierbare Anteile mit Ethylacetat, **ER<sub>MeOH/HCl</sub>:** extrahierbare Anteile mit salzsaurem Methanol, **ER<sub>DMSO</sub>:** extrahierbare Anteile mit Dimethylsulfoxid, **NER:** nicht-extrahierbare Rückstände

Die Tests mit <sup>14</sup>C-Fenbendazol ergaben ähnliche Tendenzen. Auffällige Differenzen der in **Tab. 4.7** aufgelisteten Bilanzen betrafen nur die durch Nachextraktion bedingte Freisetzung der Radioaktivität aus den zuvor mit Ethylacetat extrahierten schluffigen Sandproben nach Testgülle-Applikation (40 %) und in der Schweinegülle (4 %). Von besonderem Interesse waren hier die Resultate aus dem Metaboliten-Screening. Danach konnten durch die Nachextraktion nur Oxfendazol sowie 2 weitere nicht identifizierte Metaboliten, aber nicht <sup>14</sup>C-Fenbendazol als unveränderte Ausgangsverbindung

freigesetzt werden.

**Tab. 4.7: Bilanzierung der Tests zur mikrobiellen Abbaubarkeit von <sup>14</sup>C-Fenbendazol in Böden nach 102-tägiger Inkubation unter Berücksichtigung der Nachextraktion mit salzsaurem Methanol**

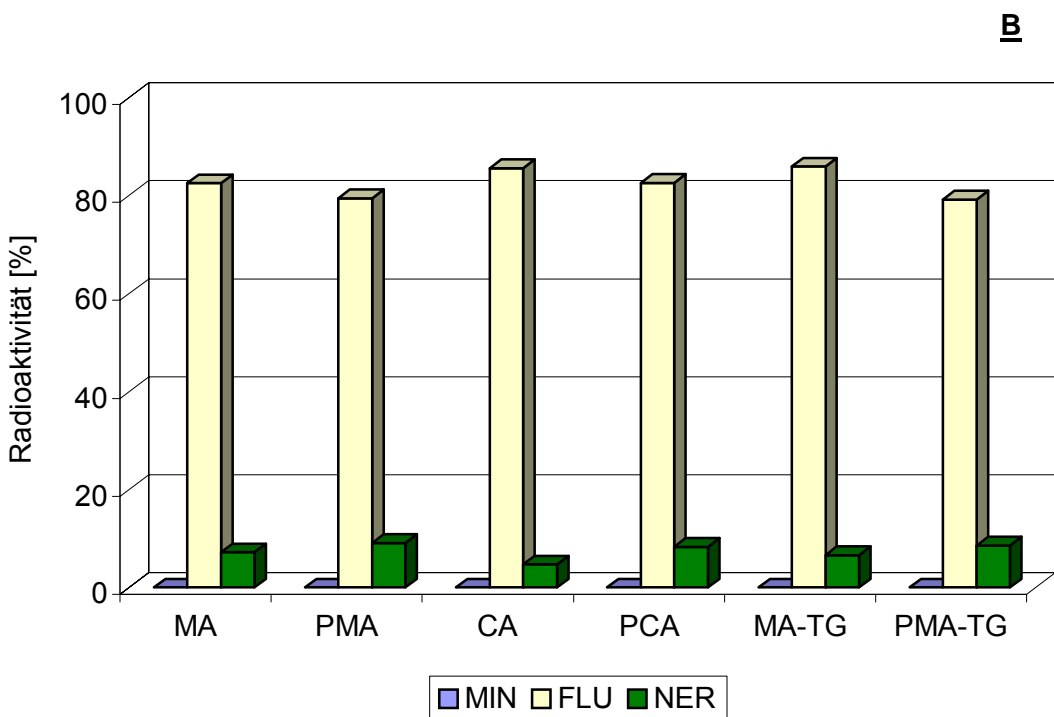
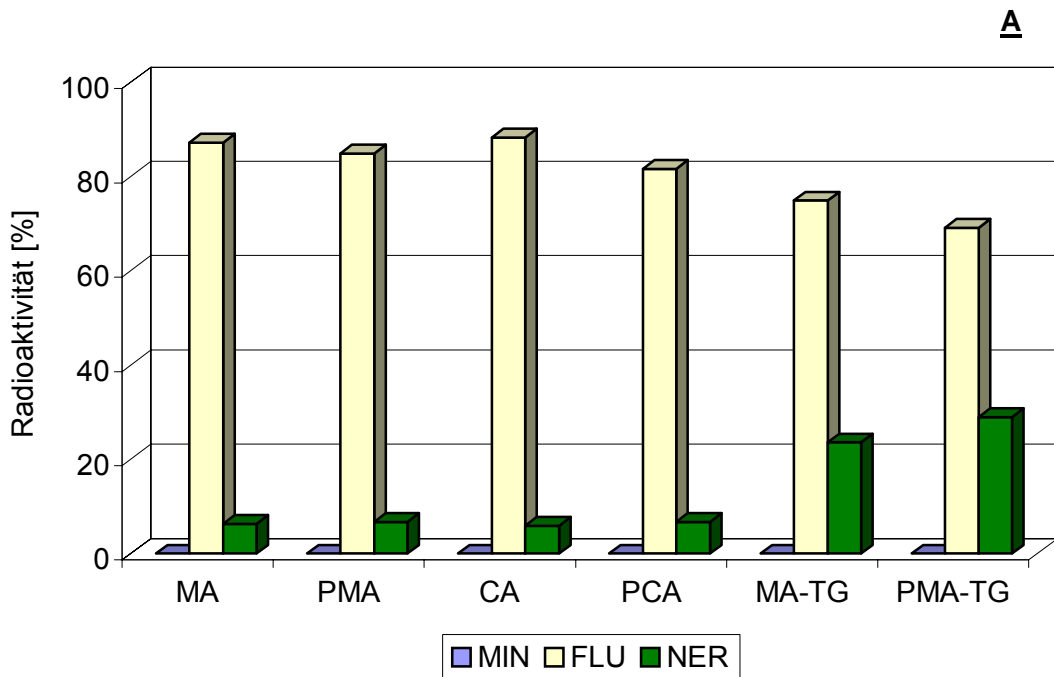
<b>Probenmatrix Applikationstechnik</b>	<b>SG STD</b>	<b>AD-A STD</b>	<b>AD-A TG</b>	<b>NW STD</b>	<b>NW TG</b>
MIN [%]	1	2	2	1	1
ER <sub>Etac</sub> [%]	84	54	46	64	32
ER <sub>MeOH/HCl</sub> [%]	4	12	21	18	40
NER [%]	8	19	38	10	20
Bilanz [%]	97	87	107	93	93

**AD-A:** schluffiger Ton (Ackerfläche), **NW:** schluffiger Sand, **SG:** Schweinegülle, **STD:** Standard-Applikation, **TG:** Testgülle-Applikation, **MIN:** Mineralisation, **ER<sub>Etac</sub>:** extrahierbare Anteile mit Ethylacetat, **ER<sub>MeOH/HCl</sub>:** extrahierbare Anteile mit salzsaures Methanol, **NER:** nicht-extrahierbare Rückstände

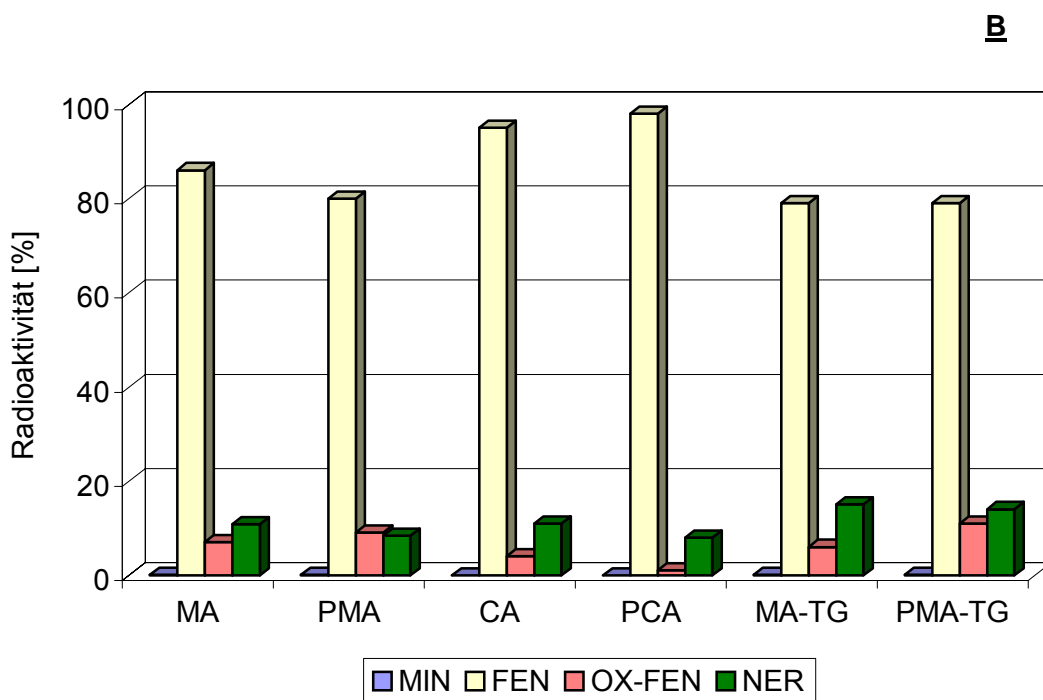
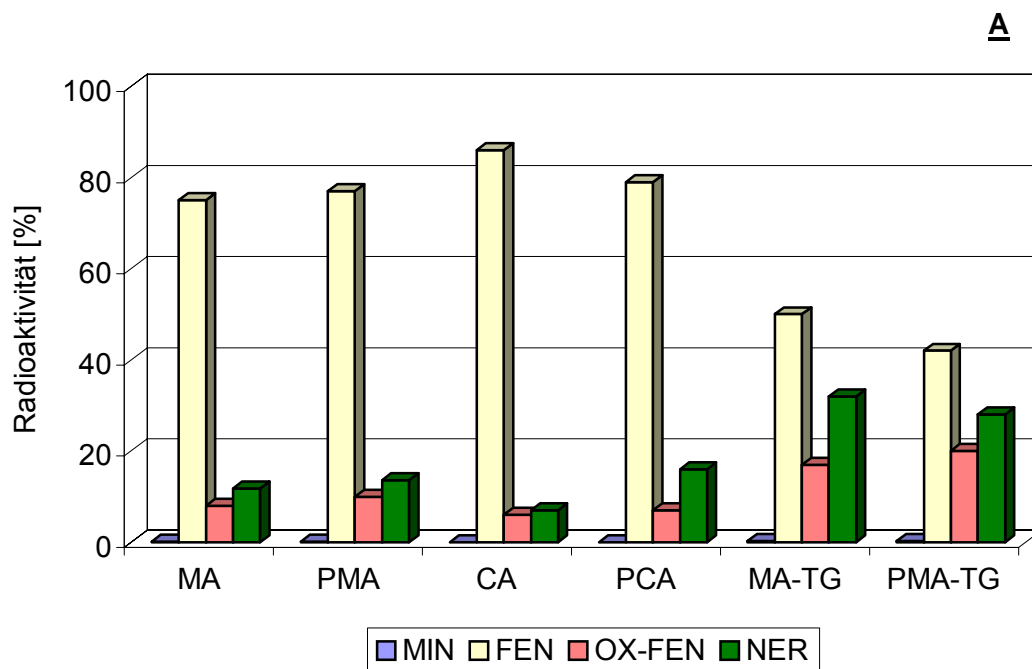
#### **Kurzzeittests zum mikrobiellen, chemischen und photoinduzierten Abbau**

Die in den Langzeittests für die Benzimidazole ermittelten Rückstandssituationen spiegeln sich in diesen Kurzzeittests wider, die unabhängig von den Versuchsvarianten zum mikrobiellen, chemischen oder photoinduzierten Abbau von den extrahierbaren Rückständen dominiert wurden (**Abb. 4.28, 4.29**). In den Abbautests mit <sup>14</sup>C-Flubendazol konnte in dieser Fraktion wiederum ausschließlich die applizierte Ausgangsverbindung detektiert werden, während neben <sup>14</sup>C-Fenbendazol <sup>14</sup>C-Oxfendazol und 2 weitere bisher nicht-identifizierte Metaboliten auftraten. Da diese jedoch nicht ausschließlich in den Extrakten der Bestrahlungsexperimenten detektiert wurden, konnte hier insgesamt nicht von relevanten photoinduzierten Einflüssen ausgegangen werden. Für diese beiden Testsubstanzen zeigte sich auch hier eine höhere Tendenz zur Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände im mikrobiell aktiveren Tonboden, die durch die Testgülle-Applikation noch intensiviert wurde.



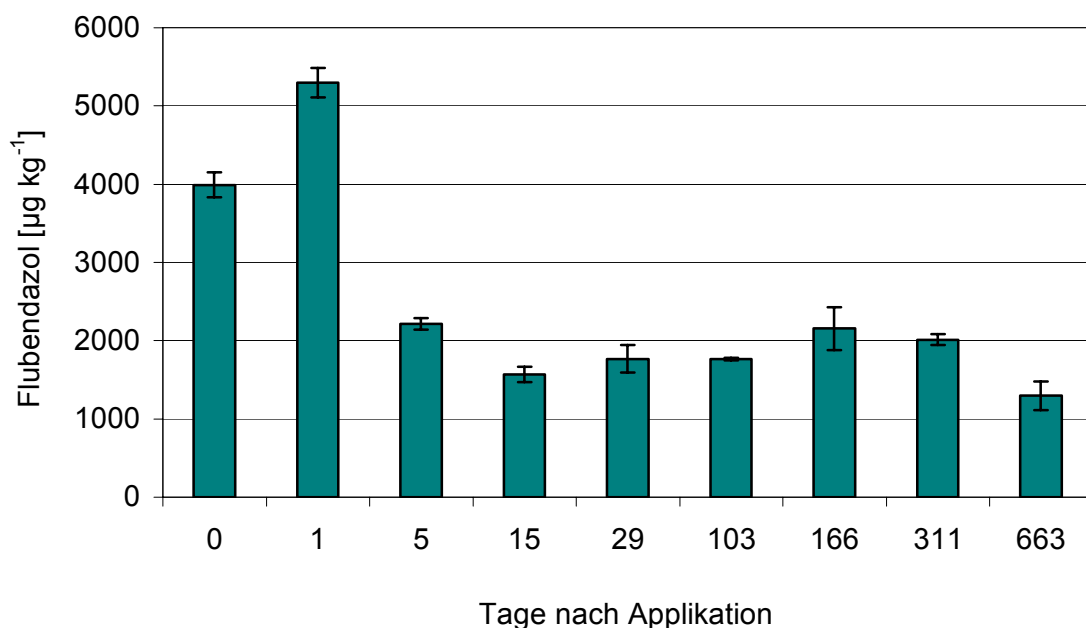


**Abb. 4.28: Mikrobieller (MA), chemischer (CA), photoinduziert-mikrobieller (PMA) und photoinduziert-chemischer (PCA) Abbau von <sup>14</sup>C-Flubendazol (FLU) A: in schluffigem Ton (AD-A) und B: schluffigem Sand (NW) nach Standard- und Testgülle-Applikation (TG) in 3 Tagen**



**Abb. 4.29: Mikrobieller (MA), chemischer (CA), photoinduziert-mikrobieller (PMA) und photoinduziert-chemischer (PCA) Abbau von  $^{14}\text{C}$ -Fenbendazol (FEN) A: in schluffigem Ton (AD-A) und B: schluffigem Sand (NW) nach Standard- und Testgülle-Applikation (TG)**

Die  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid-Freisetzung aus den applizierten Radiotracern war zwar in den mikrobiell aktiven Bodenproben geringfügig höher als in den mikrobiell inaktiven, doch bei maximalen Werten von 0.2 % von untergeordneter Bedeutung. Aus dem Vergleich der Mineralisationsraten in Dunkel- und Bestrahlungsexperimenten ließen sich keine Hinweise auf Photomineralisation ableiten.



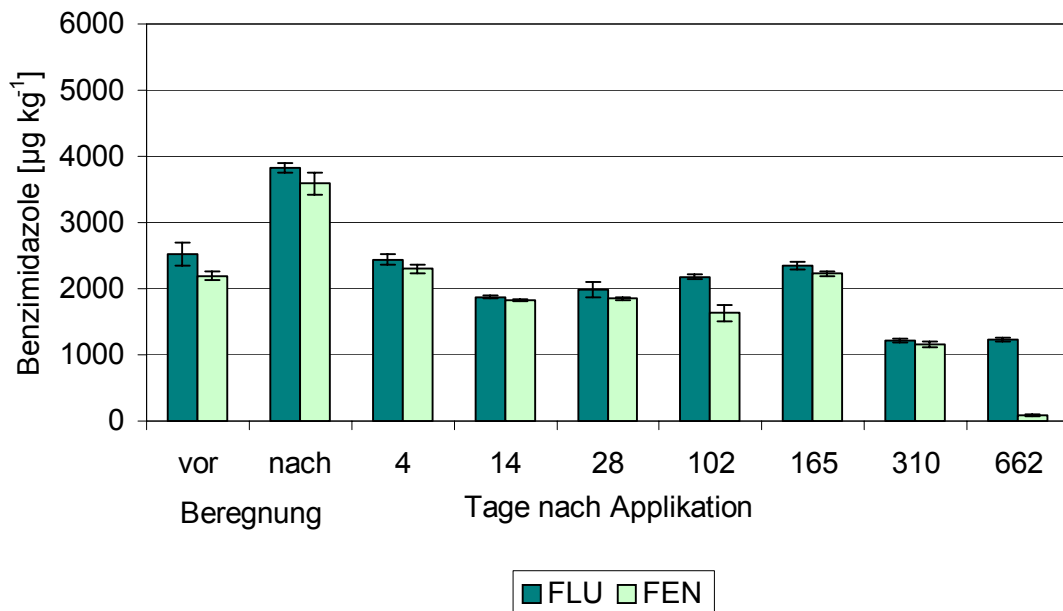
**Abb. 4.30: Flubendazol-Konzentrationen in der 0-15 cm-Bodenschicht im Ackerboden in Serie 1 nach Testgülle-Applikation und direkt anschließender Intensivberegnung (Plot 1)**

#### **Abbauverhalten unter Freilandbedingungen**

Die in den Labortests für Flubendazol und Fenbendazol ermittelten Rückstandssituationen im schluffigen Tonboden nach Testgülle-Applikation wurden auch unter den Freilandbedingungen der Testplot-Experimente gefunden. In Serie 1 wurde Flubendazol mit Testgülle auf die Weizenstoppel von Plot 1 aufgebracht, der direkt danach beregnet wurde. Aus diesem Versuchsdesign resultierten nach der Beregnung in der 0-15 cm-Bodenschicht die höchste Anfangskonzentration von 5300 µg Flubendazol kg<sup>-1</sup> Boden, die dann bis zum nächsten Probenahmetermin am Tag 5 schnell auf 2220 µg kg<sup>-1</sup> abnahm (**Abb. 4.30**). Nach 662 Tagen betrug der Konzentrationswert noch 1300

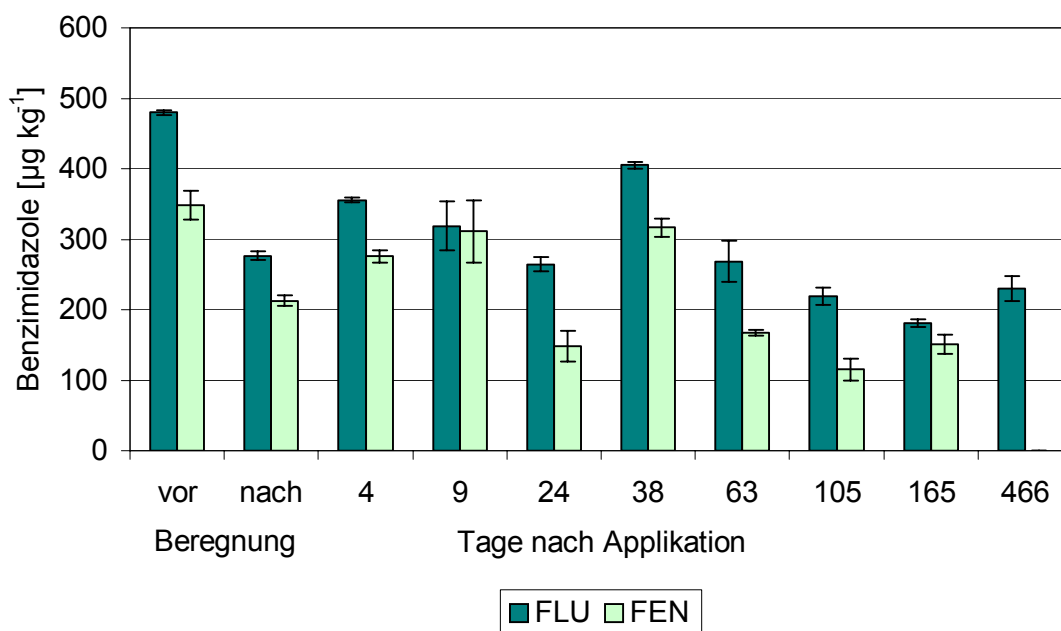
$\mu\text{g kg}^{-1}$  Boden. Aufgrund der Variation der Rückstandswerte im Untersuchungszeitraum, die ggf. auf eine ungleichmäßige Verteilung der Testgülle durch die Bodenbearbeitung nach der Intensivberegnung zurückzuführen war, ließen sich keine zuverlässigen  $\text{DT}_{50}$ -Werte berechnen.

Eine sehr ähnliche Situation wird in **Abb. 4.31** für Flubendazol auf Plot 2 dargestellt, auf dem vor der Intensivberegnung noch die Einarbeitung der Gülle in den Boden erfolgte. Hier nahm die Anfangskonzentration von 2500 auf  $1240 \mu\text{g kg}^{-1}$  Boden innerhalb von 662 Tagen ab. Der  $\text{DT}_{50}$ -Wert belief sich hier auf 345 Tage. Das gleichzeitig applizierte Fenbendazol verhielt sich im Boden weitgehend ähnlich. Nach der Beregnung nehmen in der 0-15 cm-Bodenschicht die Konzentrationswerte von  $3590 \mu\text{g Fenbendazol kg}^{-1}$  Boden innerhalb von 4 Tagen rasch auf  $2300 \mu\text{g kg}^{-1}$  ab. Nach 330 Tagen wurden noch  $1160 \mu\text{g kg}^{-1}$  nachgewiesen. Bei einer weiteren Probennahme 662 Tage nach Applikation wurden mit durchschnittlich  $82 \mu\text{g kg}^{-1}$  nur noch Konzentrationen unterhalb des Triggers von  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  Boden (VICH, 2000) ermittelt. Nach Timme et al. (1986) konnte hieraus ein  $\text{DT}_{50}$ -Wert von 144 Tagen berechnet werden.



**Abb. 4.31: Benzimidazol-Konzentrationen in der 0-15 cm-Bodenschicht im Ackerboden in Serie 1 nach Testgülle-Applikation, Bodenbearbeitung und Intensivberegnung (Plot 2)**

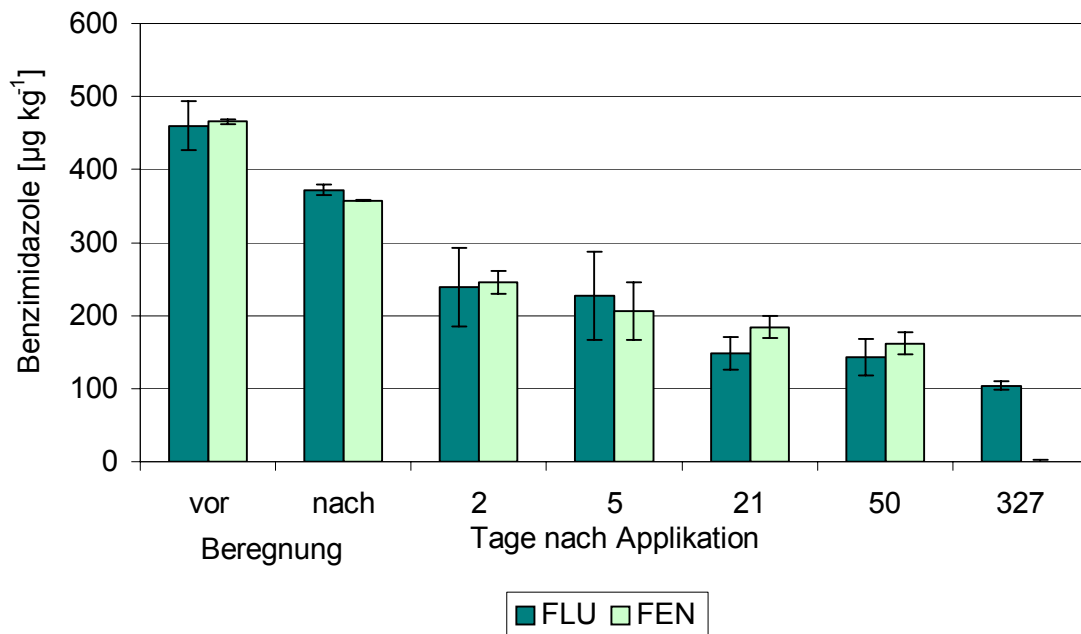
In Serie 2 lag bei einer 10-fach geringeren Aufwandmenge die Flubendazol-Konzentration unmittelbar nach der Beregnung bei  $280 \mu\text{g kg}^{-1}$  und sank innerhalb von 466 Tagen auf  $230 \mu\text{g Flubendazol kg}^{-1}$  Boden ab (**Abb. 4.32**). Die ermittelten Fenbendazol-Konzentrationen hingegen waren stets geringer. Nach der Beregnung betrug in Serie 2 die ermittelte Fenbendazol-Konzentration  $210 \mu\text{g kg}^{-1}$ , welche dann in 105 Tagen auf  $115 \mu\text{g kg}^{-1}$  absank. Zum Abschluss der Untersuchungen nach 466 Tagen waren auf diesem Testplot keine Fenbendazol-Rückstände oberhalb der Bestimmungsgrenze von  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  Boden mehr festzustellen, so dass im Vergleich zum Flubendazol für Fenbendazol ein schnellerer Abbau zu verzeichnen war. Zuverlässige  $DT_{50}$ -Werte konnten aus bereits zuvor genannten Gründen nicht berechnet werden.



**Abb. 4.32: Benzimidazol-Konzentrationen in der 0-15 cm-Bodenschicht im Ackerboden in Serie 2 nach Testgulle-Applikation, Bodenbearbeitung und Intensivberegnung**

Dieses unterschiedliche Verhalten der beiden Strukturanaloga konnte auch in der Serie 3 beobachtet werden (**Abb. 4.33**). Hier sank innerhalb von 327 Tagen die Flubendazol-Konzentration von  $372 \mu\text{g kg}^{-1}$  nach der Beregnung auf  $104 \mu\text{g kg}^{-1}$  ab. Der  $DT_{50}$ -Wert belief sich auf 126 Tage. Fenbendazol hingegen konnte auch auf diesem Testplot nach

327 Tagen nicht mehr nachgewiesen werden. Für Fenbendazol ergab sich nach Timme et al. (1986) ein  $DT_{50}$ -Wert von 22 Tagen. Insgesamt stehen die Resultate zum Abbauverhalten der Benzimidazole aus den Labortests mit denen aus den Testplot-Experimenten in Einklang, obgleich letztere aufgrund der Intensivberegnung und der aus versuchstechnischen Gründen überhöhten Ausbringungsmengen in dieser Runoff-Studie unter extremen Bedingungen durchgeführt wurden. Die Daten aus dieser Studie verdeutlichen außerdem die auf saison- und standortspezifischen Einflüsse zurückgehende Variabilität des Rückstandsverhaltens in Boden unter Freilandbedingungen.



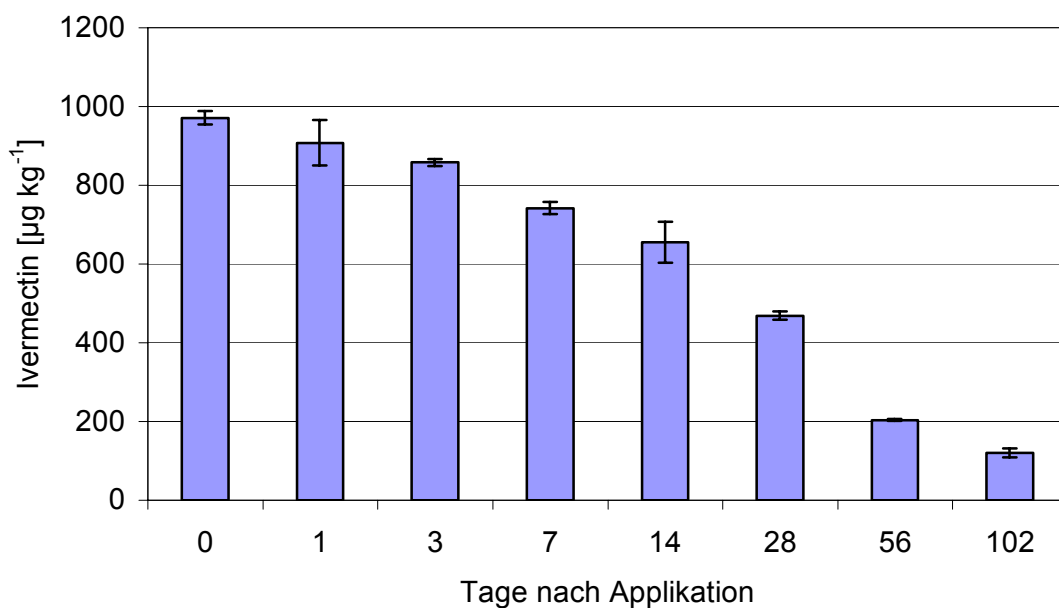
**Abb. 4.33: Benzimidazol-Konzentrationen in der 0-15 cm-Bodenschicht im Ackerboden in Serie 3 nach Testgulle-Applikation, Bodenbearbeitung und Intensivberegnung**

#### 4.3.3 Ivermectin

##### Langzeittests zum mikrobiellen Abbau

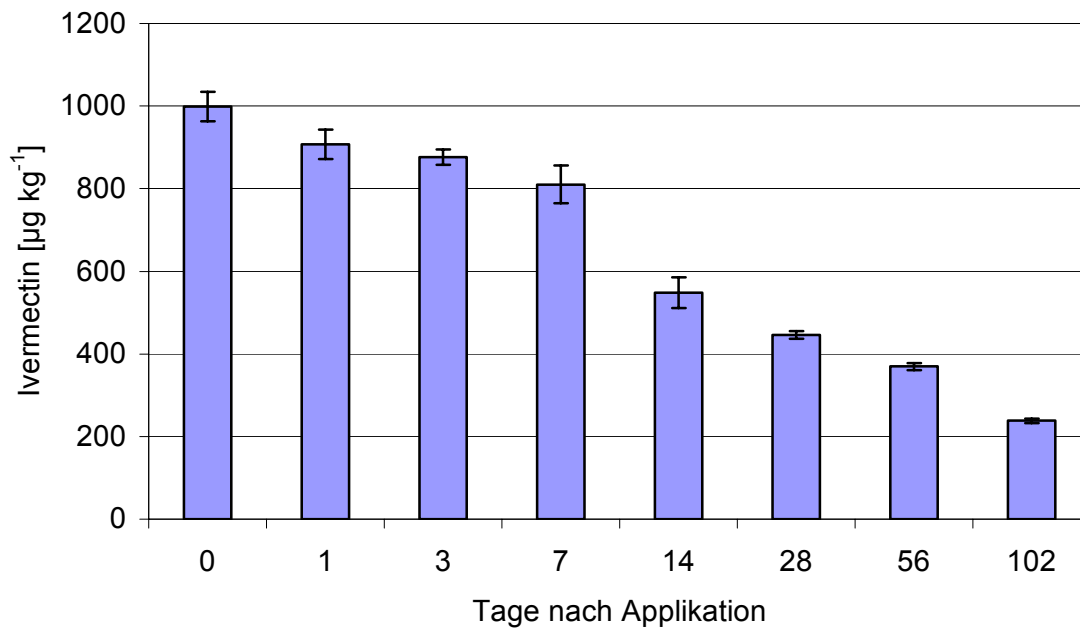
In den ruckstandsanalytisch begleiteten Labortests zum Abbauverhalten von Ivermectin in schluffigem Ton nahmen die Ivermectin-Konzentrationen von 971 auf 120  $\mu\text{g kg}^{-1}$

Boden ab (**Abb. 4.34**). Aus diesem Konzentrationsverlauf errechnete sich ein  $DT_{50}$ -Wert von 22 Tagen (Timme et al., 1986). Ein ähnliches Abbauverhalten von Ivermectin stellte auch Löffler (2003) in Wasser/Sediment-Systemen fest. Innerhalb von 100 Tagen nahm dort die anfangs applizierte Ivermectin-Konzentration auf 16 % ab. Für im Labor durchgeführte Abbauuntersuchungen im Lehmboden ermittelten Halley et al. (1989b) hingegen mit 93 bis 240 Tagen deutlich höhere  $DT_{50}$ -Werte.



**Abb. 4.34: Mikrobieller Abbau von Ivermectin in schluffigem Ton nach Standard-Applikation**

Nach Testgülle-Applikation sanken die Konzentrationen von  $998 \mu\text{g kg}^{-1}$  innerhalb von 7 Tagen sukzessive auf  $811 \mu\text{g kg}^{-1}$ , um danach bis zum Versuchsende in größeren Schritten auf  $238 \mu\text{g Ivermectin kg}^{-1}$  Boden abzufallen (**Abb. 4.35**). Trotz der im Vergleich zur Standard-Applikation höheren Rückstandskonzentrationen errechnete sich ein  $DT_{50}$ -Wert von 22 Tagen (Timme et al., 1986). Damit zeigte sich auch hier die Notwendigkeit, bereits in den Labortests das Rückstandsverhalten von Veterinärpharmaka unter dem Einfluss der Gülle zu betrachten.

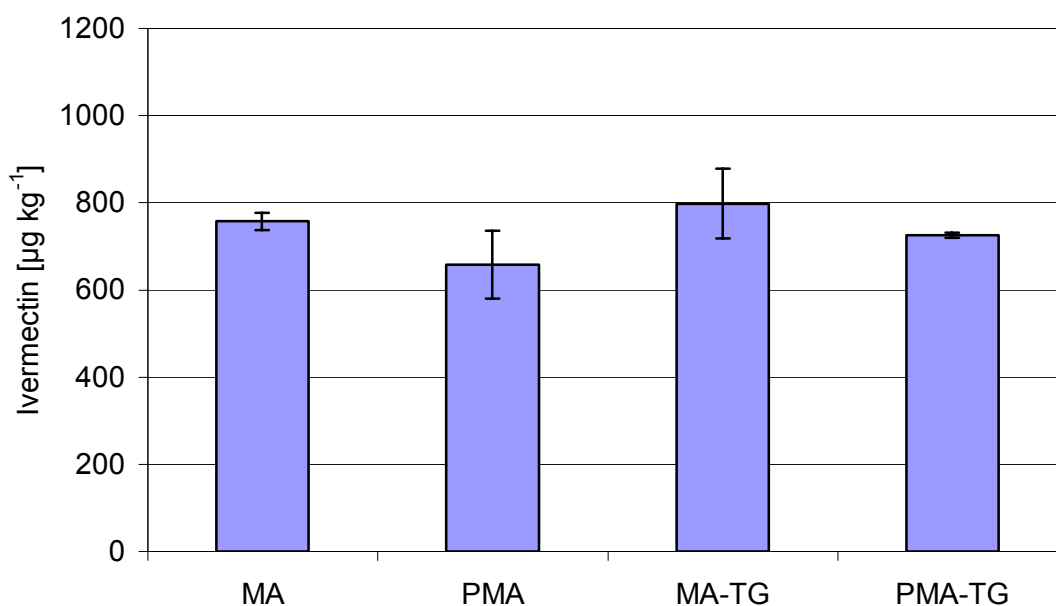


**Abb. 4.35: Mikrobieller Abbau von Ivermectin in schluffigem Ton nach Testgülle-Applikation**

#### **Kurzzeittests zum mikrobiellen und photoinduzierten Abbau**

Da die Batchtests für Ivermectin nur rückstandsanalytisch begleitet werden konnten, wurden hier nur die Varianten zum mikrobiellen und photoinduziert-mikrobiellen Abbau nach Standard- und Testgülle-Applikation verfolgt. Wie sich bereits in den Langzeittests abzeichnete, waren in den Tag-3-Proben trotz unterschiedlichen Applikationstechniken kaum Unterschiede im Rückstandsverhalten zu konstatieren. Entsprechendes galt für den Vergleich von Dunkel- und Bestrahlungsexperimenten (**Abb. 4.36**). So konnten auch Mougin et al. (2003) in ihren Untersuchungen zum photoinduzierten Abbau von Ivermectin in einem Lehm Boden erst nach 7-tägiger Exposition der Proben in Sonnenlicht Effekte feststellen. Da gemäß der Düngeverordnung (1997) allerdings von einer zur Ausbringung der Gülle zeitnahen Einarbeitung in den Ackerboden auszugehen ist, ist hier die Relevanz photoinduzierter Einflüsse auf die Abbaubarkeit von Veterinärpharmaka nur in den ersten Versuchstagen gegeben. Auf güllegedüngten Grünlandflächen könnte sich der Lichteinfluss über einen längeren Zeitraum erstrecken.



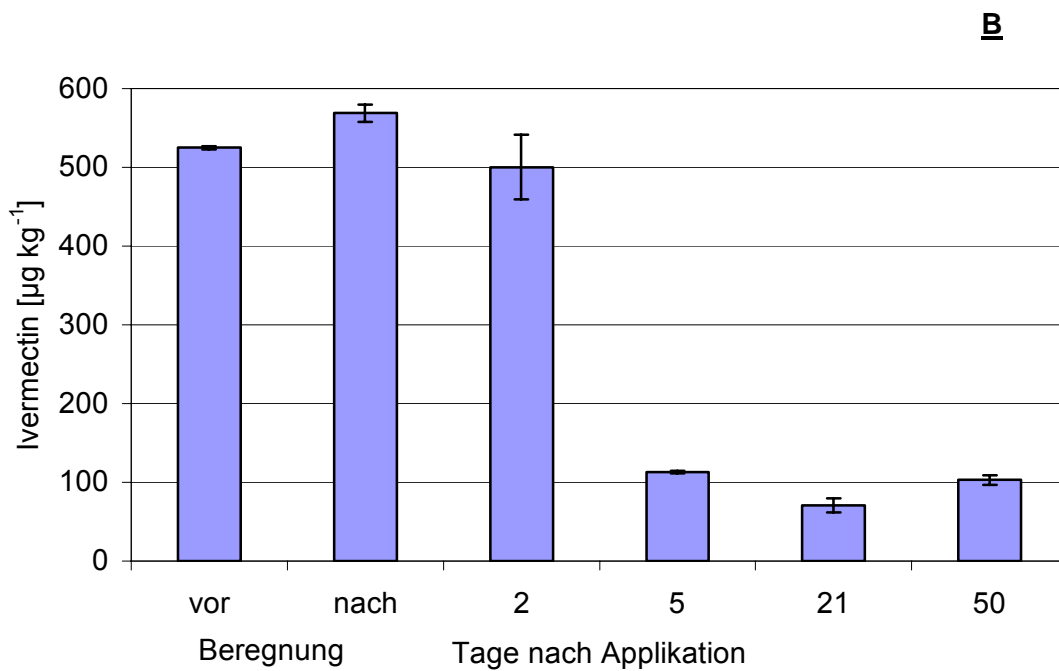
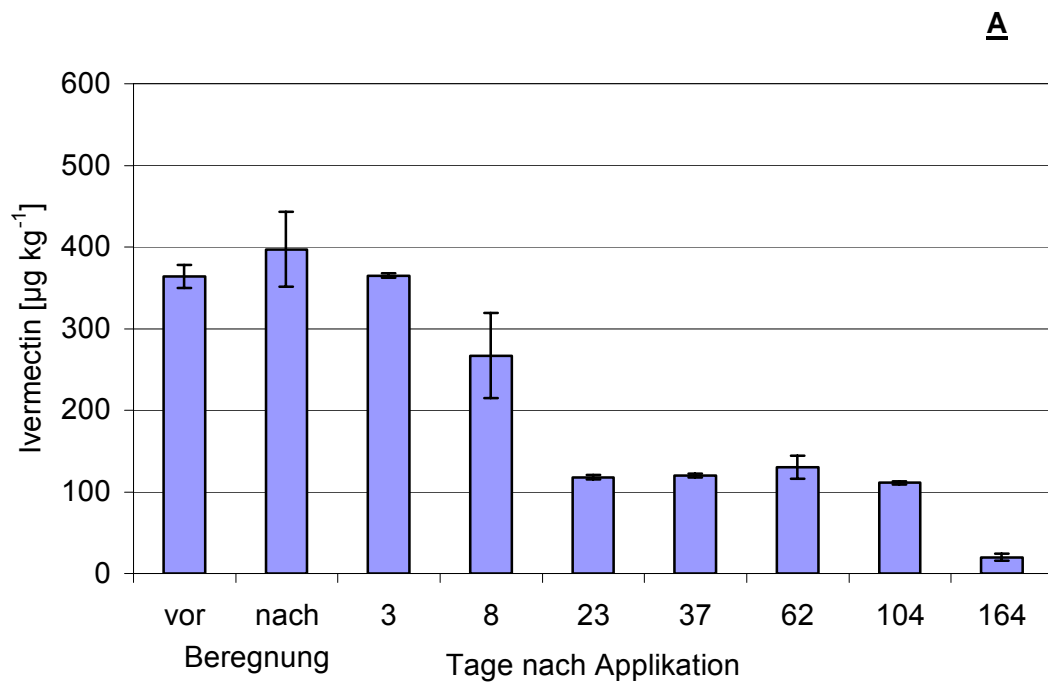


**Abb. 4.36: Mikrobieller (MA) und photoinduziert-mikrobieller (PMA) Abbau von Ivermectin in schluffigem Ton nach Standard- und Testgülle-Applikation (TG)**

#### **Abbauverhalten unter Freilandbedingungen**

Auch für Ivermectin führten die Labortests nach Testgülle-Applikation zu einer zuverlässigen Abschätzung des Abbauverhalten in schluffigem Tonboden. Das belegen die in Serie 2 und 3 durchgeführten Testplot-Experimente unter Freilandbedingungen. Bei einem  $DT_{50}$ -Wert von 12 Tagen nahm die Konzentration nach Bodenbearbeitung und Beregnung von  $397 \mu\text{g kg}^{-1}$  Boden bis zu Tag 23 auf  $118 \mu\text{g kg}^{-1}$  ab. Dieser Konzentrationswert blieb bis zur Tag-104–Probe annähernd konstant, um dann zum Versuchsende nach 164 Tagen noch einmal auf  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  Boden abzufallen (**Abb. 4.37**).

Wie auch für die Benzimidazole wurde in Serie 3 eine beschleunigte Konzentrationsabnahme von Ivermectin festgestellt. Die wesentliche Abnahme von 500 auf  $113 \mu\text{g Ivermectin kg}^{-1}$  Boden konnte hier von der Tag-2– zur Tag-5–Probe verfolgt werden. Bei annähernd konstanten Konzentrationswerten bis zu Tag 50 errechnete sich ein  $DT_{50}$ -Wert von nur noch 7 Tagen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen von Halley et al. (1989b), die einen beschleunigten Abbau von Ivermectin bei höheren Temperaturen unter Freilandbedingungen ermittelten.



**Abb. 4.37: Ivermectin-Konzentrationen in der 0-15 cm Bodenschicht im Ackerboden in A: Serie 2 und B: Serie 3 nach Testgülle-Applikation, Bodenbearbeitung und Intensivberegnung**

An dieser Stelle sei noch einmal betont, dass die Bewertung des Rückstandverhaltens von Ivermectin in Boden ausschließlich auf der rückstandsanalytischen Ermittlung von Konzentrationsverläufen der applizierten Ausgangsverbindung beruht. Auf diesem Weg kann weder eine Aussage über die Bildung von Metaboliten zur Absicherung ablaufender Abbauprozesse, noch über die Mineralisation oder sogar die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände getroffen werden.

#### 4.4 Sorption im Boden

Eine erste Abschätzung über die Mobilität der Testsubstanzen in verschiedenen Böden erfolgte mittels Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten ( $K_d$ -Werte), die in Batch-Equilibrium-Experimenten nach Standard-Applikation ermittelt wurden. Hieraus wurden dann die auf die organische Bodensubstanz normierten  $K_{oc}$ -Werte berechnet. Um die hieraus abgeleiteten Mobilitätstendenzen bewerten zu können, wird hier ähnlich wie bei der Definition von Persistenzkriterien von Veterinärpharmaka in güllegedüngten Böden auf Kriterien der Pflanzenschutzmittel-Zulassung zurückgegriffen (Boxall et al., 2001). So ist nach Fichter und Holden (1992) eine erhöhte Mobilität und Verfügbarkeit einer Chemikalie in Böden bei einem  $K_d < 5 \text{ L kg}^{-1}$  bzw.  $K_{oc} < 300 \text{ L kg}^{-1}$  anzunehmen. Eine detaillierte Klassifikation in verschiedene Mobilitätsstufen, die sich dabei ausschließlich auf die  $K_{oc}$ -Werte bezieht, wird in **Tab. 4.8** wiedergegeben.

**Tab. 4.8: Klassifikation der Mobilität von Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffen in Böden (Hollis, 1991)**

<b>Mobilitätseinstufung</b>	<b><math>K_{oc}</math> [L kg<sup>-1</sup>]</b>
immobil	> 4000
leicht mobil	500 - 4000
mäßig mobil	75 - 499
mobil	15 - 74
sehr mobil	< 15

In Ergänzung zu dieser konventionellen Vorgehensweise wurden auch  $K_d$ -Werte nach Testgülle-Applikation bestimmt. Zum einen konnten so Einflüsse der Güllematrix auf die Sorption berücksichtigt werden. Zum anderen wurde auf diesem Weg auch die reale Rückstandssituation erfasst, die sich durch die Alterung der Veterinärpharmaka während der Güllelagerung ergab.

Da sich für das Sulfonamid Sulfachlorpyridazin anhand der im ERAVMIS-Projekt ermittelten  $K_d$ -Werte deutliche Verlagerungstendenzen abschätzen ließen (Boxall et al., 2002), wurden für  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin zusätzlich Laborlysimetertests, in denen diese Testsubstanz nach Testgülle-Applikation eingebracht wurde, in den Methodenkatalog aufgenommen, um das Verlagerungsverhalten in den sich anschließenden Testplot-Experimenten nicht nur auf Basis des Sorptionsverhaltens abschätzen zu können. Schließlich wurden die Resultate aus diesen Labortests in den Testplot-Experimenten durch die rückstandsanalytische Untersuchung der Bodenschichten bis in 90 cm Tiefe überprüft.

#### 4.4.1 Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten

Die  $K_d$ - und  $K_{OC}$ -Werte, die für die einzelnen Testsubstanzen nach Standard-Applikation in verschiedenen Böden ermittelt wurden, sind in **Tab. 4.9** aufgelistet. Im untersuchten Substanzspektrum ergaben sich danach mit  $K_d$ -Werten von 1.3-5.6  $\text{L kg}^{-1}$  bzw.  $K_{OC}$ -Werten von 81-238  $\text{L kg}^{-1}$  die höchsten Verlagerungspotentiale für die Sulfonamid-Derivate Sulfadiazin, Sulfamethoxazol und Acetyl-Sulfamethoxazol, die allerdings unter Zugrundelegung der Mobilitätseinstufung nach Hollis (1991) als nur mäßig mobile Substanzen einzustufen sind. Wesentliche bodenartspezifische Unterschiede fielen insgesamt nicht auf. Ähnliche  $K_d$ -Werte liegen für Sulfachlorpyridazin mit 0.9  $\text{L kg}^{-1}$  in einem tonigen Lehm und 1.8  $\text{L kg}^{-1}$  in einem sandigen Lehm (Boxall et al., 2002) sowie für Sulfadiazin ( $K_d$ : 2.0  $\text{L kg}^{-1}$ ,  $K_{OC}$ : 124  $\text{L kg}^{-1}$ ) in einem schluffigem Lehm mit einem  $C_{\text{org}}$ -Gehalt von 1.6 % vor (Aust und Thiele-Bruhn, 2003).

Bei  $K_{OC}$ -Werten von 500 bis >4000  $\text{L kg}^{-1}$  ist für die Benzimidazole von keiner Mobilität in den untersuchten Böden auszugehen. Entsprechendes gilt für Ivermectin im untersuchten schluffigen Tonboden. Hier liegen die  $K_d$ - und  $K_{OC}$ -Werte bei 102 bzw. 6375  $\text{L kg}^{-1}$ . Letzterer wird von in der Literatur angegebenen  $K_{OC}$ -Werten von 5300 bzw. 15700  $\text{L kg}^{-1}$  eingeschlossen (Gruber et al., 1990, Halley et al., 1989b).

**Tab. 4.9: Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten nach Standard-Applikation**

Testsubstanz/ Bodenart	$K_d$ [L kg <sup>-1</sup> ]	$K_{oc}$ [L kg <sup>-1</sup> ]
<b>Sulfadiazin</b>		
AD-A	2.1 ± 0.3	131 ± 19
AD-G	5.6 ± 0.1	187 ± 3
NW	1.9 ± 0.3	238 ± 38
<b>Sulfamethoxazol</b>		
AD-A	1.3 ± 0.1	81 ± 6
AD-G	2.9 ± 0.2	97 ± 7
<b>Acetyl-Sulfamethoxazol</b>		
AD-A	2.1 ± 0.3	131 ± 19
AD-G	3.1 ± 0.1	103 ± 3
<b>Flubendazol</b>		
AD-A	141 ± 30	8813 ± 1875
NW	92 ± 30	11500 ± 3750
<b>Fenbendazol</b>		
AD-A	63 ± 7	3938 ± 438
NW	58 ± 3	7250 ± 375
<b>Ivermectin</b>		
AD-A	102 ± 21	6375 ± 1313

**AD-A:** Adenstedt Ackerboden, **AD-G:** Adenstedt Grünlandboden,  
**NW:** Nienwohlde

Nach Testgülle-Applikation wurde für <sup>14</sup>C-Sulfadiazin- und <sup>14</sup>C-Sulfamethoxazol-Rückstände ein deutlicher Anstieg der  $K_d$ -Werte auf > 11 L kg<sup>-1</sup> konstatiert (**Tab. 4.10**). Hieraus ließ sich bedingt durch die Alterung der Rückstände während der kurzfristigen Güllelagerung eine deutliche Verminderung ihrer Mobilität im Tonboden abschätzen. Ein hoher Anstieg des  $K_d$ -Wertes nach Testgülle-Applikation zeigte sich für <sup>14</sup>C-Sulfadiazin-Rückstände im schluffigen Sand (NW), dessen Ursache für diese starke Sorptionsneigung trotz Mehrfachbestimmungen nicht eindeutig geklärt werden konnte. Ein eventueller Einfluss der hier eingesetzten Rindergülle auf das Sorptionsverhalten war nicht auszuschließen (Höltge, 2005). Ein gegensätzliches Sorptionsverhalten nach Testgül-

le-Applikation ergab sich allerdings für  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol-Rückstände, da hier mit  $1.6 \text{ L kg}^{-1}$  ein der Standard-Applikation entsprechender  $K_d$ -Wert ermittelt werden konnte. Ähnliche Tendenzen ergaben sich auch nach Testklärschlamm-Applikation, die bereits im "Boden-Projekt" untersucht wurde (Kreuzig et al., 2005 a).

**Tab. 4.10: Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten der Testsubstanzen nach Testgülle-Applikation<sup>5</sup>**

Boden	SDZ	SMZ	A-SMZ	FLU	FEN	IVE
<b>AD-A</b>	14 ± 1	11 ± 2	1.6 ± 0.3	134 ± 27	42 ± 3.0	115 ± 17
<b>AD-G</b>	20 ± 1	14 ± 1	1.5 ± 0.1	---	---	---
<b>NW</b>	126 ± 12	---	---	40 ± 10	31 ± 0.9	---

$K_d$ -Werte in [ $\text{L kg}^{-1}$ ], ---: nicht untersucht;

**AD-A:** Adenstedt Ackerboden; **AD-G:** Adenstedt Grünlandboden; **NW:** Nienwohld

Für  $^{14}\text{C}$ -Flubendazol und  $^{14}\text{C}$ -Fenbendazol führte die Testgülle-Applikation in beiden untersuchten Bodenarten zu einer geringfügigen Absenkung der  $K_d$ -Werte (**Tab. 4.10**). Da jedoch auch hier noch  $K_d$ -Werte  $> 30 \text{ L kg}^{-1}$  vorlagen, konnte trotz des Einflusses der Gülle nicht auf eine Erhöhung der Mobilität geschlossen werden, so dass beide Benzimidazole als immobile Substanzen einzustufen waren.

Für Ivermectin konnte nach Testgülle-Applikation ein  $K_d$ -Wert von  $115 \pm 17 \text{ L kg}^{-1}$  ermittelt werden, der auch für diese Testsubstanz im Vergleich zur Standard-Applikation keinen relevanten Einfluss der Gülle auf das Sorptionsverhalten erkennen ließ. Insgesamt ist auf Grundlage dieser Ergebnisse auch Ivermectin als immobil anzusehen und keine Verlagerungstendenz im Freiland anzunehmen. Dieser Aspekt wurde durch Säulenexperimente von Oppel et al. (2004) und Ternes et al. (2005) belegt, die keine Ivermectin-Rückstände im Perkolat feststellen konnten.

<sup>5</sup> Mit der "Testgülle-Applikation" wurden  $^{14}\text{C}$ -markierte Veterinärpharmaka-Rückstände, bestehend aus der jeweiligen Ausgangsverbindung und die während der Güllelagerung gebildeten Umwandlungsprodukte sowie die nicht-extrahierbaren Rückstände, in diesen Batch-Equilibrium-Tests appliziert. Damit beziehen sich die hier ermittelten  $K_d$ -Werte auf die Gesamtückstandssituation (z.B.  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin-Rückstände).

#### 4.4.2 Laborlysimetertests mit $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin

In Ergänzung zu den Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten und als Zwischenschritt zu den Untersuchungen zur Verlagerung unter Freilandbedingungen wurden für  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin Laborlysimetertests mit ungestörten Bodenmonolithen von 30 cm Länge und 15 cm innerer Durchmesser des tonigen Schluffbodens der Adenstedter Ackerfläche durchgeführt. Nach Testgülle-Applikation, oberflächlicher Einarbeitung der Gülle in die Bodenkerne, einer diskontinuierlichen Beregnung von  $100 \text{ L m}^{-2}$  innerhalb von 14 Tagen und den Bedingungen des ungesättigten Wasserflusses wurden insgesamt nur 5 % der anfangs mit dem Radiotracer applizierten Radioaktivität im Perkolat gefunden. Das Metaboliten-Screening belegte, dass im Perkolat  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin als unveränderte Ausgangsverbindung mit 3 % auftrat. Insgesamt zeigte dieser geringe Substanzdurchbruch, dass die anhand der nach Standard-Applikation ermittelten  $K_d$ -Werte ausgewiesenen Mobilitätstendenzen für Sulfadiazin in diesem Tonboden eher überschätzt werden (Kreuzig und Höltge, 2005).

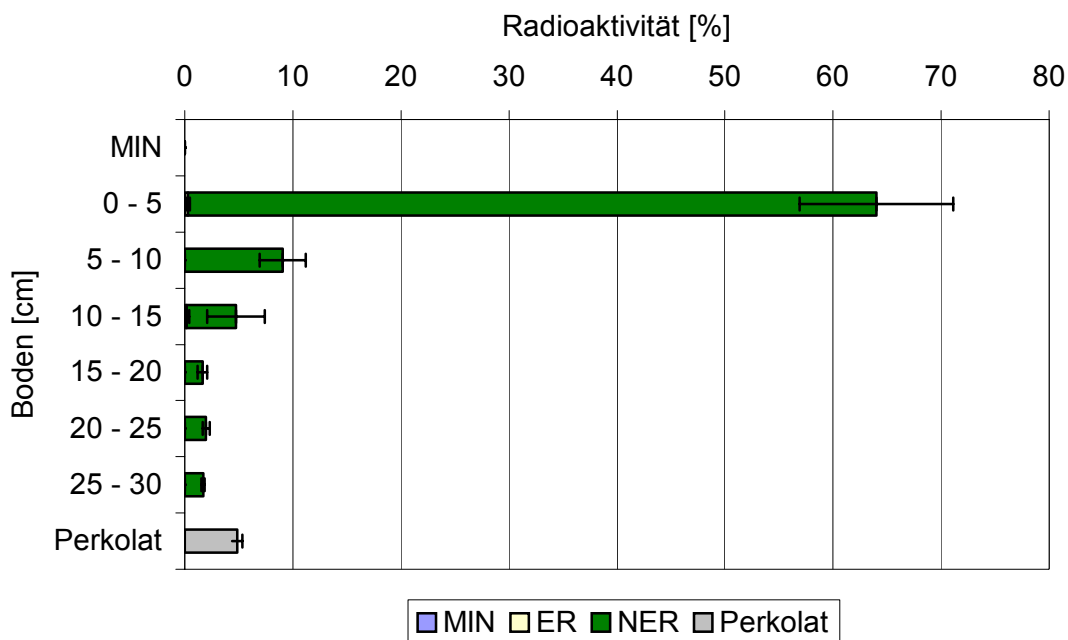


Abb. 4.38: Verlagerung und Abbau von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin nach Testgülle-Applikation in Laborlysimetertests mit schluffigem Ton in 14 Tagen

In Ergänzung zur Perkolat-Untersuchung wurden nach Versuchsende auch die Verlagerungstendenzen für  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin in den Bodenmonolithen ermittelt. Die hierfür aufgestellten Bilanzen sind in **Abb. 4.38** dargestellt. Sie verdeutlichen, dass das Rückstandsverhalten von  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin auch in diesen Laborlysimetertests von der Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände dominiert wurde, so dass 64 % der anfangs applizierten Radioaktivität in der 0-5 cm-Bodenschicht zurückgehalten wurden. In den tieferen Bodenschichten nahmen die Rückstände dann sukzessive ab. Die hier ermittelten Verlagerungstendenzen von Sulfadiazin im schluffigen Tonboden werden auch in von Winckler et al. (2004) beschriebenen Lysimeterstudien (150 cm Höhe, 100 cm innerer Durchmesser) in humosem Sandboden unter Freilandbedingungen bestätigt. Auch die Laborlysimetertests (60 cm Höhe, 25 cm innerer Durchmesser) von Kay et al. (2005) für Sulfachlorpyridazin in tonigem Lehm stimmen hiermit überein.

Insgesamt zeigt sich hier bereits vor der Auswertung der Verlagerungsuntersuchungen in den Testplot-Experimenten, dass die Abschätzung von Verlagerungstendenzen in Böden nicht ausschließlich auf der Ermittlung von  $K_d$ -Werten nach Standard-Applikation erfolgen kann. Wie diese Laborlysimetertests ferner belegen, wird die Zuverlässigkeit der Bewertung von Verlagerungstendenzen durch die kombinierte Perkolat- und Bodenanalyse erhöht. So kann aus der schnellen Bildung nicht-extrahierbarer  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin-Rückstände in Böden und der Tatsache, dass 80 % der insgesamt ins Perkolat gelangten Radioaktivität der Verlagerung innerhalb der ersten 6 Berechnungstage unterliegen, das höchste Verlagerungsrisiko angenommen werden, wenn Starkregenereignisse in unmittelbarer Zeitnähe zur Gülleausbringung und ihrer Einarbeitung in den Boden erfolgen.

#### **4.4.3 Verlagerungstendenzen unter Freilandbedingungen**

Da die Testplot-Experimente für die eigentliche Runoff-Studie aus versuchstechnischen Gründen unter extremen Bedingungen, die durch hohe Ausbringungsmengen und die Intensivberegnung von  $50 \text{ mm h}^{-1}$  für 2 Stunden gegeben waren (s. Kap. 3.4 und 5), durchgeführt wurden, war es konsequent, nicht nur das Abbau-, sondern auch das Verlagerungsverhalten unter Freilandbedingungen zu studieren. Für die in den Testplot-Serien via Testgülle applizierten Sulfonamide Sulfadiazin, Sulfadimidin und Sulfamethoxazol konnte auf der Ackerfläche keine Verlagerung in tiefere Bodenschich-



ten festgestellt werden, obgleich die Beprobung bis in 90 cm Bodentiefe zeitnah zum Ende der Beregnung einsetzte. Damit stehen die  $K_d$ -Werte nach Testgülle-Applikation und die Verlagerungstendenzen in den Laborlysimetertests mit den Freilanduntersuchungen im Einklang. Für diesen Boden läßt sich damit kein erhöhtes Verlagerungsrisiko für die untersuchten Sulfonamide ableiten. Diese Einschätzung wird auch durch die Untersuchungen von Kay et al. (2004) widerspiegelt. Dort konnten zwar Sulfachlorpyridazin im Dränagewasser eines Tonbodens infolge präferentiellen Flusses nachgewiesen werden, doch wurde für einen ebenfalls untersuchten Sandboden nur eine geringe Verlagerungstendenz und damit ein geringes Risiko der Grundwasserkontamination abgeleitet. Im Gegensatz hierzu stehen allerdings Untersuchungen von Ham-scher et al. (2005) und Ternes et al. (2004), die Sulfadimidin nach langfristiger Gülleausbringung in Bodenwasser bzw. Sulfamethoxazol nach Verregnung gereinigten Abwassers im Grundwasser nachwiesen.

Für die Benzimidazole Flubendazol und Fenbendazol, die anhand der ermittelten  $K_d$ - bzw.  $K_{OC}$ -Werte als immobile Substanzen eingestuft wurden, ließen sich auch unter den extremen Versuchsbedingungen der Testplot-Experimente keine Verlagerungstendenzen aufzeigen, aus denen Einträge in Grundwasserleiter abzuleiten wären. Neben den Rückständen in der 0-15 cm-Bodenschicht, in denen diese mit der Einarbeitung der Gülle verteilt wurden, ließen sich zwar in Serie 1 auch Rückstände nach 100 Tagen punktuell bis 60 cm Bodentiefe nachweisen, doch waren die Konzentrationen von 200 bzw. 166  $\mu\text{g}$  Flubendazol  $\text{kg}^{-1}$  (Plot 1 und 2) sowie 141  $\mu\text{g}$  Fenbendazol  $\text{kg}^{-1}$  Boden im Vergleich zur Höhe der Ausbringungsmenge als niedrig zu bezeichnen. Danach wurden hier genau wie in der 60-90 cm-Bodenschicht während des gesamten Untersuchungszeitraumes keine Benzimidazol-Rückstände gefunden. Entsprechendes gilt für die Beprobung der 15-30 cm-Schicht nach 662 Tagen. In Serie 2 waren Benzimidazol-Rückstände noch einmal in der 15-30 cm-Schicht nach 9 und 24 Tagen im Bereich der Bestimmungsgrenze nachweisbar. Darüber hinaus war der Unterboden rückstandsfrei. Unter Berücksichtigung der im Vergleich zu den in der Praxis der Intensivtierhaltung zu erwartenden Rückstandskonzentrationen in der Gülle und der daraus resultierenden Eintragungssituation in Böden lassen sich die hier in den tieferen Bodenschichten nachgewiesenen Benzimidazol-Rückstände nur mit den extremen Versuchsbedingungen erklären. Ein realistisches Risiko eines Eintrages in Grundwasserleiter kann hieraus nicht abgeleitet werden. Die unter Freilandbedingungen erzielten Resultate dieser Testplot-Studien stehen somit im Einklang mit den in den Labortests durchge-

fürten  $K_d$ -Wert-Bestimmungen. Diese Übereinstimmung gilt auch für Ivermectin, das in tieferen Bodenschichten nicht nachgewiesen werden konnte.

## 4.5 Ökotoxizität ausgewählter Veterinärpharmaka

### 4.5.1 Wirkungen in terrestrischen Testsystemen

#### Substratinduzierte Respiration

Der mikrobielle Abbau ist der effektivste Prozess, der einer Akkumulation von organischen Fremdstoffen in Böden entgegenwirkt. Deswegen ist es von besonderem Interesse, inwieweit mit der Gülle in Böden eingetragene Veterinärpharmaka als biologisch wirksame Substanzen selbst eine Wirkung auf die mikrobielle Bodenbiozönose auslösen. Erste Untersuchungen hierzu wurden gleichzeitig zur Testplot-Serie 1 durchgeführt. In dieser wurden Testgülle mit definiert gealterten Sulfonamid- bzw. Benzimidazol-Rückständen auf Acker- und Grünlandplots appliziert. Die Einflüsse dieser Applikationen auf die mikrobielle Bodenaktivität wurde in auf diesen Testplots sowie auf Kontrollplots entnommenen Bodenproben untersucht.

Als Maß für die mikrobiellen Bodenaktivitäten wurde die probeninhärente Sauerstoffzehrung mittels substratinduzierter Respiration ermittelt (s. Kap. 3.1). In **Tab. 4.11** sind die einzelnen Messwerte für einen Zeitraum bis 28 Tage nach der jeweiligen Testgülle-Applikation aufgeführt. Bei Werten von  $0.6-2.0 \text{ mg O}_2 \text{ 100 g TS}^{-1} \text{ h}^{-1}$  lässt sich für alle Versuchsvarianten sicher herauslesen, dass die mikrobielle Aktivität trotz der teilweise deutlich überhöhten Ausbringungsmengen an Veterinärpharmaka-Rückständen bis  $500 \text{ mg Tests substanz kg}^{-1}$  Gülle nicht nachhaltig beeinträchtigt wurde; genaue Konzentrationsangaben der Testsubstanzen in der Testgülle nach kurzfristiger Lagerung sind in Kap. 5 explizit ausgewiesen. Beim Auftreten adverser Effekte wären Werte der Sauerstoffzehrung von  $< 0.1 \text{ mg O}_2 \text{ 100 g TS}^{-1} \text{ h}^{-1}$  zu erwarten gewesen, wie sie für die Labortests zum chemischen Abbau von Veterinärpharmaka in Boden durch Autoklavieren erreicht wurden. Eine Beeinflussung durch einzelne Veterinärpharmaka lässt sich unter den Freilandbedingungen nicht eindeutig erkennen. Schließlich spielt in dieses Versuchsdesign auch die Einarbeitung der applizierten Testgülle in den Ackerboden hinein, die zur kleinflächigen Variabilität von Bodeneigenschaften beitragen kann. Fer-

ner kann die Gülle selbst auch einen die mikrobielle Bodenaktivität fördernden Einfluss ausüben, da mit ihrer Ausbringung auch leicht abbaubare organische Substanzen und Nährstoffe in den Boden eingebracht werden.

**Tab. 4.11: Mikrobielle Aktivitäten in Bodenproben von Test- und Kontrollplots in Serie 1**

Probe- nahme	substratinduzierte Respiration [mg O <sub>2</sub> 100 g TS <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]					
	Tag	PLOT 0 <sub>A</sub>	PLOT 1	PLOT 2	PLOT 3	PLOT 4
0	1.1	0.8	0.8	1.4	1.0	1.9
4	0.9	0.7	0.6	1.4	1.0	1.4
14	1.3	1.4	1.4	2.0	1.4	1.5
28	1.4	0.9	0.9	1.0	2.0	1.8

**PLOT 0<sub>A</sub>**: Nullparzelle Acker, **PLOT 1**: Acker mit Flubendazol, **PLOT 2**: Acker mit Flubendazol und Fenbendazol, **PLOT 3**: Acker mit Sulfadiazin, Sulfadimidin, Sulfamethoxazol, **PLOT 4**: Grünland mit Sulfadiazin, Sulfadimidin, Sulfamethoxazol, **PLOT 0<sub>G</sub>**: Nullparzelle Grünland

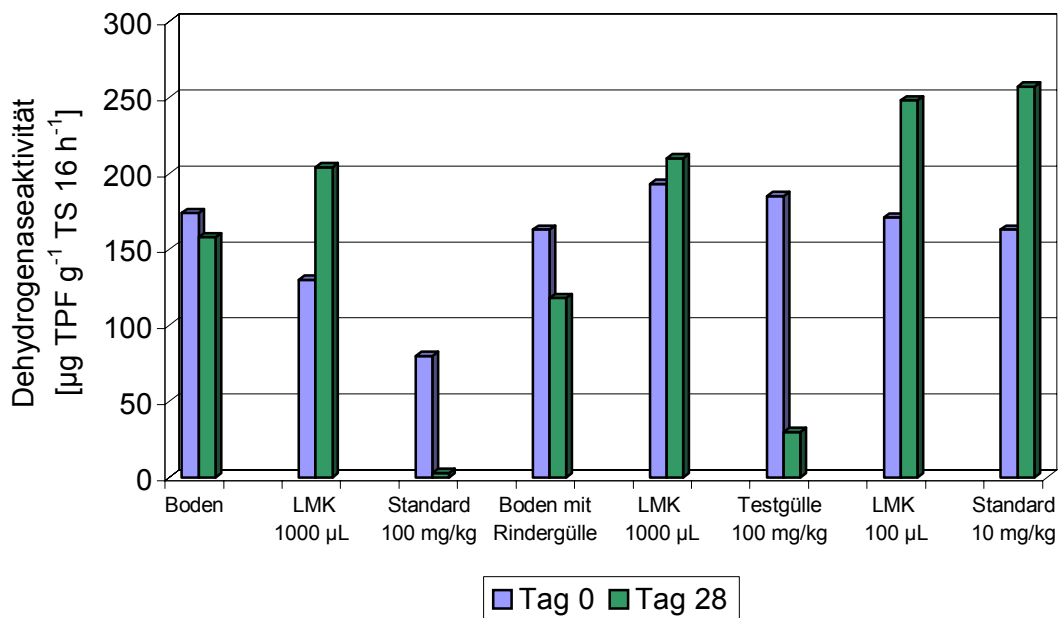
### Dehydrogenaseaktivitätstest

Unter Laborbedingungen ergaben die Messungen zur Dehydrogenaseaktivität für die Sulfonamide und die Benzimidazole ein ähnliches Bild. So konnte in den exemplarisch für Sulfamethoxazol und Fenbendazol durchgeführten Batchexperimenten selbst in Konzentrationen bis 100 mg kg<sup>-1</sup> Boden keine akute Wirkung dieser Testsubstanzen auf die Bodenmikroorganismen festgestellt werden.

Ivermectin zeigte dagegen in diesem Konzentrationsbereich nach Standard-Applikation eine akute Wirkung, bei der der Messwert der Tag-0-Probe des undotierten Bodens von 174 µg TPF g<sup>-1</sup> TS 16 h<sup>-1</sup> auf 80 µg TPF g<sup>-1</sup> TS 16 h<sup>-1</sup> zurückging (**Abb. 4.39**). Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ist hier eindeutig ein Wirkstoff-Effekt abzulesen. Dieser akute Effekt trat dagegen nach Testgülle-Applikation nicht auf, was hier auf eine verminderte Bioverfügbarkeit von Ivermectin schließen lässt. In den korrespondierenden Tag-28-Proben nahm die Dehydrogenaseaktivität sogar auf 3.4 µg TPF g<sup>-1</sup> TS 16 h<sup>-1</sup> ab, was auf eine chronische Wirkung gegenüber den Mikroorganismen hindeutet.

Dieser Effekt zeichnete sich auch in den Batchexperimenten nach Testgülle-Applikation ab. Hier scheint die anfangs verminderte Bioverfügbarkeit von Ivermectin mit der Inkubationsdauer anzusteigen.

Insgesamt ist in diesen Tests allerdings die Höhe der Testkonzentration zu berücksichtigen. Im Vergleich hierzu leiten sich in den Testplot-Experimenten aus der Applikation von Testgülle, die aus versuchstechnischen Gründen gegenüber der Praxis der Intensivtierhaltung deutlich überhöht auf 50 mg Ivermectin kg<sup>-1</sup> Rindergülle eingestellt war, Konzentrationen von nur 0.6 mg Ivermectin kg<sup>-1</sup> Boden ab. Bei einer Testkonzentrationen von 10 mg kg<sup>-1</sup> Boden konnten keine adversen Effekte registriert werden.



**LMK:** Lösungsmittel-Kontrolle für 100 bzw. 1000 µL Methanol,  
Nominalkonzentrationen im Boden: 10 mg kg<sup>-1</sup> bzw. 100 mg kg<sup>-1</sup>, n = 3

**Abb. 4.39: Dehydrogenaseaktivitätstest für Ivermectin in schluffigem Ton nach Standard- und Testgülle-Applikation im Vergleich zu undotiertem Boden**

In diesem Test sowie in der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle mit 100 µL Methanol war ferner auffällig, dass in den Tag-28-Proben deutlich höhere Dehydrogenaseaktivitäten konstatiert wurden. Hieraus lässt sich ableiten, dass Methanol auch in diesen

Dotiervolumina keine toxische Wirkung auf die Bodenmikroorganismen ausübt und mit zunehmender Inkubationsdauer in diesen Batchexperimenten sogar als Substrat metabolisiert wird.

#### **Kontakttest mit *Arthrobacter globiformis***

Für die Testsubstanzen Sulfamethoxazol, Fenbendazol und Ivermectin ergab der Kontakttest mit *Arthrobacter globiformis* selbst bei einer Testkonzentration von 100 mg kg<sup>-1</sup> Boden weder nach Standard- noch nach Testgülle-Applikation eine eindeutige Hemmwirkung. Dieses gilt für die Tag-0- und die Tag-28-Proben aus den einzelnen Batchexperimenten. Die ermittelten Messwerte sind in **Tab. 4.12** aufgeführt. Die negativen Werte deuten dabei auf eine fördernde Wirkung hin. Die Abweichung der berechneten Hemmwirkungen vom Nulleffekt liegen im Bereich der Streuung der einzelnen Messwerte und zeigen damit noch keine Effekte an. Die Spannweiten zwischen den Einzelwerten der Doppelbestimmungen betragen insgesamt 1-18 % des Mittelwertes.

**Tab. 4.12: Hemmwirkung von Sulfamethoxazol, Fenbendazol und Ivermectin im Boden-Kontakttest mit *Arthrobacter globiformis* nach Standard- und Testgülle-Applikation (n = 2)**

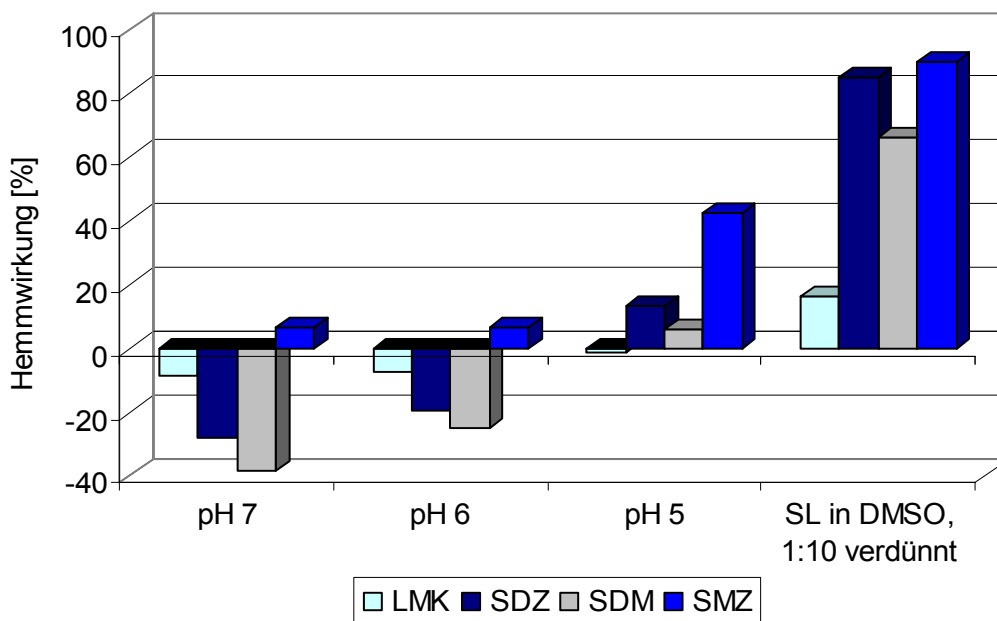
Test-sub-stanz	Hemmwirkung [%]					
	Sulfamethoxazol # [100 mg kg <sup>-1</sup> ]		Fenbendazol [100 mg kg <sup>-1</sup> ]		Ivermectin [100 mg kg <sup>-1</sup> ]	
	Standard-Applikation	Testgülle-Applikation	Standard-Applikation	Testgülle-Applikation	Standard-Applikation	Testgülle-Applikation
Tag 0	2.39	7.25	-1.04	-8.13	-6.03	10.18
Tag 28	3.73	-1.03	0.62	4.59	4.68	-1.55

# Nach Testgülle-Applikation betrug die Sulfamethoxazol-Konzentration infolge der Alterung der Rückstände während der kurzfristigen Güllelagerung nur 40 mg kg<sup>-1</sup> Boden (s. Kap. 4.1.1)

#### **Solid-Phase-Test mit *Vibrio fischeri***

Auch in den Kontakttests mit *Vibrio fischeri* wurden die Testsubstanzen als Standard-

lösung sowie mit Testgülle appliziert und damit jeweils eine Konzentration von  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  Boden eingestellt. Für Sulfamethoxazol ist infolge der kurzfristigen Lagerung der Testgülle und der damit einhergehenden Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände eine ca. 40 %-ige Konzentrationsabnahme zu berücksichtigen (s. Stabilitätstests in Gülle, Kap. 3.1.2). Zur Ermittlung des Einflusses der Matrix des schluffigen Tonbodens wurde zusätzlich Seesand als Feststoffmatrix verwendet. Für Sulfamethoxazol ergaben sich in diesen Tests deutliche Unterschiede. Im Seesand betrug die Hemmwirkung 64 %, während für die Tests mit Boden nach Standardlösung keine Hemmwirkung auftrat. Unter dem Einfluss der Testgülle konnte eine verstärkte Lichtemission der Testspezies gemessen werden. Die Hemmwirkung von Sulfamethoxazol beim Kontakttest mit Sand ist vergleichbar mit jener, die in wässriger Lösung unter Einfluss von Dimethylsulfoxid als Lösungsvermittler erzielt wurde.



**LMK:** Lösungsmittel-Kontrolle, **SL:** Stammlösung, **Testkonzentration:**  $45.5 \text{ mg L}^{-1}$

**Abb. 4.40: Einfluss des pH-Wertes bzw. des Lösungsvermittlers DMSO auf die Hemmwirkung von Sulfonamiden in wässriger Lösung beim Leucht-bakterientest**

Neben der Affinität von Sulfamethoxazol zur Bodenmatrix kann die Bioverfügbarkeit

dieses amphoteren Sulfonamides auch vom bodeninhärenten pH-Wert von 7 beeinflusst werden. Diese pH-abhängige Hemmwirkung konnte im Test mit wässrigen Lösungen für die Sulfonamide Sulfadiazin, Sulfadimidin und Sulfamethoxazol registriert werden (**Abb. 4.40**). Hier zeigte sich, dass bis zu einem pH-Wert von 6 Sulfadiazin und Sulfadimidin in der untersuchten Konzentrationsstufe von  $45.5 \text{ mg L}^{-1}$  stimulierend auf die Leuchtemission der Leuchtbakterien wirkten. Mit fallendem pH-Wert sank die stimulierende Wirkung von Sulfadiazin und Sulfadimidin bzw. stieg die hemmende Wirkung von Sulfamethoxazol. Bei einem pH-Wert von 5 wurde zwar für alle Sulfonamide eine Hemmwirkung beobachtet, doch fiel diese nur für Sulfamethoxazol mit 42 % deutlich aus. Sulfadiazin verursachte eine Reduzierung der Lichtemission von 13 % und Sulfadimidin von 6 %. Die Unterschiede in der Wirkung der drei Sulfonamide lassen sich dabei nicht auf ihre bei pH 5 vorliegenden Anteile an ungeladenen Molekülen zurückführen, da diese bei Sulfadimidin ( $\text{pK}_s$ -Wert von 7.4) am höchsten und bei Sulfamethoxazol ( $\text{pK}_s$ -Wert von 5.6) am niedrigsten sind.

Für Fenbendazol ergab der Kontakttest mit Seesand und Tonboden ein ähnliches Bild. Während in den Tag-0-Proben nach der Dotierung der Seesandproben die mittlere Hemmwirkung 79 % betrug, konnten nach Standard- und Testgülle-Applikation zu den Bodenproben nur noch Hemmwirkungen von 43 bzw. 29 % registriert werden. In den Tag-28-Proben war die Hemmwirkung bei beiden Testvarianten in die Nähe des Nulleffektes gesunken. Für Ivermectin wurde in keiner der durchgeführten Kontakttests eine Hemmwirkung gegenüber *Vibrio fischeri* ermittelt. Im Seesand und im Boden nach Standard-Applikation wurde die Biolumineszenz sogar gesteigert. Da die Stimulierung auch eine Wirkung auf die Leuchtbakterien darstellt, lässt sich daraus folgern, dass Ivermectin für die Leuchtbakterien bioverfügbar, aber nicht toxisch war. Bei Testgülle-Applikation lag die Wirkung dagegen nahe dem Nulleffekt, die Bioverfügbarkeit war demzufolge reduziert. Nach 28 Tagen Inkubation wurde sowohl nach Standard- als auch nach Testgülle-Applikation keine Wirkung auf die Leuchtemission mehr gemessen.

#### 4.5.2 Wirkungen auf aquatische Testspezies

Die Durchführung von Testplot-Experimenten ist der erste Schritt, Oberflächenausträge von Veterinärpharmaka von gütgedüngten Acker- und Grünlandböden zu quantifizieren. Für eine Abschätzung des Runoff-Risikos von Veterinärpharmaka ist aber auch die Eintragungssituation in Fließgewässer sowie die Ökotoxizität von eingetragenen Substanzen gegenüber aquatischen Organismen von Bedeutung. Aufgrund dieser Zusammenhänge wurden neben der Ermittlung des Rückstands- und Abflussverhaltens der einzelnen Testsubstanzen ökotoxikologische Labortests mit Makroinvertebraten durchgeführt.

##### Sulfonamide

Die Sulfonamide Sulfadimidin und Sulfadiazin stellten sich in allen Labortests selbst in der höchsten Konzentration von 100 bzw. 50 mg L<sup>-1</sup> als nicht akut toxisch gegenüber den Testspezies heraus. Da es sich bei diesen um antibakterielle Wirkstoffe handelt, war eine niedrige Akuttoxizität gegenüber der untersuchten Makrofauna auch nicht zu erwarten. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen von Wollenberger et al. (2000), die einen EC<sub>50</sub>-Wert von 221 mg L<sup>-1</sup> für Sulfadiazin nach 48 h ermittelten. In einer anderen Arbeit gibt Müller (1982) einen 48 h-LC<sub>50</sub> von 88 mg L<sup>-1</sup> an. Aus der Studie von Coats et al. (1976) gehen für die Arten *D. magna*, *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) und die pulmonate Schnecke *Physa* sp. LC<sub>50</sub>-Werte von > 10 mg Sulfadimidin L<sup>-1</sup> hervor.

##### Benzimidazole

Die Benzimidazole Fenbendazol und Flubendazol zeigten dagegen bei einer Maximalkonzentration von 1 mg L<sup>-1</sup> Effekte gegenüber 6 der 9 untersuchten Arten. Die Effekte beider Benzimidazole waren sehr ähnlich und die festgestellten EC<sub>50</sub>-Werte lagen zwischen 12,2 und 1800 µg L<sup>-1</sup>. Folgende Reihenfolge der Sensitivität, bezogen auf den niedrigsten EC<sub>50</sub>-Wert, wurde für beide Testsubstanzen festgestellt: *B. calyciflorus* ≈ *C. elegans* ≈ *A. sulcicollis* > *A. aquaticus* > *R. ovata* > *G. pulex* > *D. gonocephala* ≈ *T. tubifex* ≈ *D. magna*. Die errechneten EC<sub>50</sub>-Werte für alle Arten, Testsubstanzen und Testzeitpunkte werden in **Tab. 4.13** bis **4.15** aufgeführt. **Tab. 4.16** zeigt die dazugehörigen NOEC-Werte.



Tab. 4.13: Testkonzentrationsbereiche und EC<sub>50</sub>-Werte für Flubendazol<sup>g</sup>

		<i>D. gonocephala</i>	<i>C. elegans</i>	<i>B. calyciflorus</i>	<i>T. tubifex</i>	<i>R. ovata</i>	<i>D. magna</i>	<i>G. pulex</i>	<i>A. aquaticus</i>	<i>A. sulci-collis</i>
<b>Test-dauer</b> [h]	<b>Konz.</b> [µg L <sup>-1</sup> ]	62.5-1000	62.5-1000	250-8000	15.6-1000	125-1000	6.25-200	62.5-1000	62.5-1000	62.5 1000
<b>24</b>		> 1000	> 1000	> 8000 <sup>d</sup>	40.5 (32.9-49.8)	> 1000	446.6 (286.8-695.4)	204.5 (180.7-231.4) <sup>f</sup>	> 1000	> 1000
<b>48</b>		35.3 (12.3-101.4) <sup>f</sup>	-	-	25.4 (22.1-29.4)	> 1000	70.1 (57.1-86.0)	165.0 (144.5-188.4) <sup>f</sup>	> 1000	> 1000
<b>72</b>		11.2 (0.40-331.6) <sup>f</sup>	-	-	22.1 (unreliable variance)	> 1000	31.4 (25.7-38.2)	157.4 (131.9-187.7)	> 1000	> 1000
<b>96</b>		30.0 <sup>a</sup>	-	-	22.1 (20.7-23.6)	1000 <sup>e</sup>	-	105.4 (87.0-127.8)	> 1000 <sup>c</sup>	> 1000

<sup>a</sup>: arithmetisches Mittel aus 0 % Effekt in den Kontrollen und 100% Effekt in der niedrigsten Konzentration [62.5 µg L<sup>-1</sup>], <sup>b</sup>: abgeschätzt aus 48% Effekt in der der höchsten Konzentration [1000 µg L<sup>-1</sup>] <sup>c</sup>: extrapoliert: 1800 µg L<sup>-1</sup>, <sup>d</sup>: Lösemittelkontrolle enthielt 0.08 % DMSO, <sup>e</sup>: abgeschätzt aus 53% Effekt in der der höchsten Konzentration [1000 µg L<sup>-1</sup>], <sup>f</sup>: die Ergebnisse der beiden höchsten Konzentrationen [500, 1000 µg L<sup>-1</sup>] wurden für die Probit-Analyse nicht berücksichtigt, da sie irreguläre Konzentrations-Wirkungsbeziehungen aufwiesen, <sup>g</sup>: 95% Konfidenzbereiche in Klammern, **n.d.**: nicht bestimmbar (< 50% Effekt), -: Überlebensrate der Kontrollen < 90%, daher kein endgültiger Test durchgeführt

Tab. 4.14: Testkonzentrationsbereiche und EC<sub>50</sub>-Werte für Fenbendazol <sup>9</sup>

		<i>D. gonocephala</i>	<i>C. elegans</i>	<i>B. calyciflorus</i>	<i>T. tubifex</i>	<i>R. ovata</i>	<i>D. magna</i>	<i>G. pulex</i>	<i>A. aquaticus</i>	<i>A. sulci- collis</i>
<b>Test- dauer</b> [h]	<b>Konz.</b> [µg L <sup>-1</sup> ]	62.5-1000	62.5-1000	250-8000	15.6-1000	125-1000	6.25-200	62.5-1000	62.5-1000	62.5 1000
<b>24</b>		> 1000	> 1000	> 8000 <sup>d</sup>	46.5 (39.5-54.8)	> 1000	319.4 (124.1- 822.0)	> 1000	> 1000	> 1000
<b>48</b>		54.2 (30.3-96.8) <sup>f</sup>	-	-	32.0 (26.8-38.1)	> 1000	16.7 (12.2-20.0)	228.1 (192.1- 270.9) <sup>f</sup>	> 1000	> 1000
<b>72</b>		47.3 (24.0-93.2) <sup>f</sup>	-	-	30.5 (25.6-36.4)	> 1000	12.2 (10.5-14.1)	178.9 (147.5- 217.0) <sup>f</sup>	> 1000	> 1000
<b>96</b>		31.25 (0.0-62.5) <sup>a</sup>	-	-	32.0 (26.8-38.1)	1000 <sup>b</sup>	-	146.4 (123.0- 174.3)	> 1000 <sup>c</sup>	> 1000

<sup>a</sup>: arithmetisches Mittel aus 0 % Effekt in den Kontrollen und 100% Effekt in der niedrigsten Konzentration [62.5 µg L<sup>-1</sup>], <sup>b</sup>: abgeschätzt aus 48% Effekt in der der höchsten Konzentration [1000 µg L<sup>-1</sup>], <sup>c</sup>: extrapoliert 1300 µg L<sup>-1</sup>, <sup>d</sup>: Lösemittelkontrolle enthielt 0.08 % DMSO, <sup>e</sup>: abgeschätzt aus 53% Effekt in der der höchsten Konzentration [1000 µg L<sup>-1</sup>], <sup>f</sup>: die Ergebnisse der beiden höchsten Konzentrationen [500, 1000 µg L<sup>-1</sup>] wurden für die Probit-Analyse nicht berücksichtigt, da sie irreguläre Konzentrations-Wirkungsbeziehungen aufwiesen, <sup>9</sup>: 95% Konfidenzbereiche in Klammern, **n.d.**: nicht bestimmbar (< 50% Effekt), -: Überlebensrate der Kontrollen < 90%, daher kein endgültiger Test durchgeführt

Tab. 4.15: Testkonzentrationsbereiche und EC<sub>50</sub>-Werte für Ivermectin

		<i>D. gonocephala</i>	<i>C. elegans</i>	<i>B. calyciflorus</i>	<i>T. tubifex</i>	<i>R. ovata</i>	<i>D. magna</i>	<i>G. pulex</i>	<i>A. aquaticus</i>	<i>A. sulci-collis</i>
<b>Test-dauer</b> [h]	<b>Konz.</b> [µg L <sup>-1</sup> ]	62.5-1000	1.3-163.4	162.3-5230	625-10000	6.25-100	0.125-4	10.625-10	250-8000	0.25-8
<b>24</b>		n.d.	17.5 (13.4-22.9)	1961 (1308-2615)	> 10000	44.4 (57.9-522.1)	0.88 (0.77-1.08)	3.3 (2.8-3.9)	2358 (1719-3235)	181.7 (46.5-143.6)
<b>48</b>		686.6 (567.9-830.2)	-	-	> 10000	19.4 (15.9-23.6)	0.59 (0.49-0.72)	2.4 (2.1-2.8)	818.3 (656.9-1020)	36.3 (22.0-59.9)
<b>72</b>		348.9 (248.1-490.9)	-	-	3178 (2774-3640)	19.7 (16.0-24.2)	0.42 (0.35-0.52)	1.6 (1.4-1.8)	548.3 (450.4-667.6)	23.3 (16.3-33.4)
<b>96</b>		675.2 (618.6-736.9)	-	-	1866 (1623-2146)	17.0 (14.1-20.5)	-	1.4 (1.1-1.6)	390.3 (315.7-482.5)	114.3 (10.3-19.8)

Tab. 4.16: NOEC-Werte [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]

Test-dauer [h]	<i>D. gonocephala</i>	<i>C. elegans</i>	<i>B. calyciflorus</i>	<i>T. tubifex</i>	<i>R. ovata</i>	<i>D. magna</i>	<i>G. pulex</i>	<i>A. aquaticus</i>	<i>A. sulci-collis</i>
<b>FLU</b>									
24	125	> 1000	> 1000	15.6	> 1000	125	125 <sup>b</sup>	> 1000	> 1000
48	< 62.5	-	-	15.6	> 1000	31.3	125	> 1000	> 1000
72	< 62.5	-	-	15.6	500	< 15.6	125	> 1000	> 1000
96	< 62.5	-	-	15.6	500	-	62.5	> 1000	> 1000
<b>FEN</b>									
24	500	> 1000	> 1000	31.3	> 1000	50	125 <sup>b</sup>	> 1000	> 1000
48	< 62.5	-	-	15.6	> 1000	12.5	125	> 1000	> 1000
72	< 62.5	-	-	15.6	500	12.5	125	> 1000	> 1000
96	< 62.5	-	-	15.6	500	-	62.5	> 1000	> 1000
<b>IVE</b>									
24	500	2.6	1308	< 10000	50	0.5	1.25	1000	40
48	500	-	-	< 10000	12.5	0.25	1.25	500	20
72	125	-	-	2500	6.3	0.25	1.25	250	5
96	500	-	-	1250	12.5	-	1.25	250	5

<sup>a</sup>: Testkonzentrationen entsprechen Tab. 6.1-6.3, <sup>b</sup>: jedoch kein signifikanter Unterschied bei 500  $\mu\text{g L}^{-1}$

Keine Effekte konnten bei *C. elegans*, *B. calyciflorus* und *A. sulcicollis* ausgelöst werden. Die Crustaceen *A. aquaticus* und *G. pulex* wiesen  $EC_{50}$ -Werte zwischen 100 und 2000  $\mu\text{g L}^{-1}$  auf, während die sensitivsten Arten, *D. gonocephala*, *T. tubifex* und *D. magna*,  $EC_{50}$ -Werte zwischen 10 und 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  zeigten. Die gleiche Reihenfolge fand sich auch für die NOEC-Werte, die in **Tab. 4.16** aufgelistet sind. Diese Ergebnisse stimmen mit Daten früherer Untersuchungen überein. So wurde für Fenbendazol ein  $EC_{50}$ -Wert nach 48 h von 12  $\mu\text{g L}^{-1}$  angegeben (US-FDA, 1995). Martinez-Grueiro und Martinez-Fernandez (1988) fanden, dass Fenbendazol und Flubendazol Konzentrationen von 0.5 bzw. 10  $\text{mg L}^{-1}$  nach 7 Tagen eine 90 %-ige Mortalität bei *C. elegans* bewirkten. Ein weiteres Benzimidazol-Anthelminthikum wies innerhalb von 24 h einen  $EC_{50}$ -Wert von 230  $\mu\text{g L}^{-1}$  gegenüber *D. magna* auf (Koschorreck et al., 2002). Auch in den vorliegenden Ergebnissen lagen bei *D. magna* die  $EC_{50}$ -Werte nach 24 h höher als der nach 48 und 72 h.

### Ivermectin

Gegenüber dem Antiparasitikum Ivermectin zeigten alle Testspezies toxische Effekte. Bei den Ivermectin-Tests lagen die  $EC_{50}$ -Werte zwischen 0.42 und 1961  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Interessanterweise ergaben sich bei 7 der 9 untersuchten Arten deutliche Unterschiede in der Empfindlichkeit im Vergleich zu den Benzimidazolen: *B. calyciflorus*  $\approx$  *T. tubifex* > *D. gonocephala* > *A. aquaticus* > *C. elegans*  $\approx$  *R. ovata*  $\approx$  *A. sulcicollis* > *G. pulex* > *D. magna*. Während sich *B. calyciflorus* stets als die am wenigsten, *D. magna* hingegen als die empfindlichste Arten herausstellten, lag die Sensitivität der Arten *C. elegans*, *G. pulex*, *A. aquaticus* und *A. sulcicollis* um den Faktor 100 bis 1000 höher als gegenüber den Benzimidazolen. Nur *T. tubifex* erwies sich gegenüber Ivermectin als weniger empfindlich als gegenüber Fenbendazol und Flubendazol. Für Ivermectin liegen in der Literatur zahlreiche Angaben vor, die eine hohe Toxizität der Substanz gegenüber Arthropoden bestätigen. Halley et al. (1989a) fanden einen 48 h- $LC_{50}$  von nur 0.025  $\mu\text{g L}^{-1}$  bei *D. magna*. Warum in den Untersuchungen zum "Runoff-Projekt" ein fast 20-fach höherer Wert gemessen wurde, kann anhand der vorliegenden Daten nicht entschieden werden. Auch Lungenschnecken erwiesen sich als sensitiv mit  $LC_{50}$ -Werten von 120 bis 250  $\mu\text{g Ivermectin L}^{-1}$  (Okafor, 1990). Bereits bei deutlich niedrigeren Konzentrationen ist danach mit Verhaltensänderungen und Lähmungserscheinungen zu rechnen, was mit den hier ermittelten  $EC_{50}$ -Werten übereinstimmt. Während *T. tubifex* in der vorliegenden Studie einen 72 h- $EC_{50}$  von 3178  $\mu\text{g L}^{-1}$  aufwies (1866  $\mu\text{g L}^{-1}$  nach 96 h),

erwies sich ein anderer Oligochaet, *Lumbriculus variegatus*, mit einem 72 h-LC<sub>50</sub> von ca. 500 µg L<sup>-1</sup> als deutlich empfindlicher gegenüber Ivermectin (Ding et al., 2001). Gegenüber Ivermectin ist der Nematode *C. elegans* im Vergleich mit den Benzimidazolen als deutlich sensitiver einzuschätzen. Dieses Ergebnis stimmt wiederum mit den Daten von Martinez-Grueiro und Martinez-Fernandez (1988) überein, die nach 7 Tagen einen LC<sub>90</sub> von 5 µg L<sup>-1</sup> angeben.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Tests zur aquatischen Ökotoxikologie, dass die Benzimidazole und Ivermectin bei einigen Arten schon im unteren µg L<sup>-1</sup>-Bereich toxische Wirkungen hervorrufen können. Damit erscheinen die genannten Substanzen auf Basis der vorliegenden Daten als ökotoxikologisch relevant. Eine Ableitung von Umweltkonzentrationen, bei denen keine Effekte zu erwarten sind („predicted-no-effect-concentration“, PNEC) würde nach OECD (2003) auf den akuten 48 h EC<sub>50</sub>-Daten für *D. magna* basieren und einen Sicherheitsfaktor von 1000 verwenden. Die daraus resultierenden PNEC-Werte (0.017 µg L<sup>-1</sup> für Fenbendazol, 0.07 µg L<sup>-1</sup> für Flubendazol und 0.0006 µg L<sup>-1</sup> für Ivermectin) sind außerordentlich niedrig. Dies verdeutlicht, dass eine genaue Erfassung der Exposition von Gewässerorganismen hinsichtlich der Substanzkonzentration und Dauer notwendig ist, um verlässliche Daten über Umweltkonzentrationen und daraus folgend ein mögliches Gefährdungspotential zu erlangen. Diesbezüglich ist ferner zu berücksichtigen, dass in den hier durchgeführten Tests die Testspezies einer Exposition über die wässrige Phase ausgesetzt waren. Um diese zu gewährleisten wurde insbesondere für die nicht wasserlöslichen Benzimidazole Dimethylsulfoxid als Lösungsvermittler eingesetzt. Da diese Substanzen im Fall eines Runoff-Ereignisses bevorzugt über den partikelassoziierten Transport in Oberflächengewässer eingetragen werden, sollten in weitergehenden Untersuchungen auch Kontakttests mit benthischen Organismen einbezogen werden.

## 5. Abflussverhalten von Veterinärpharmaka von güllegedüngten Böden

Zielsetzung dieser Testplot-Experimente unter Freilandbedingungen war es, erste Erkenntnisse zum Abflussverhalten von Veterinärpharmaka von güllegedüngten Böden zu erarbeiten. Die Versuchsdurchführung zu praxisüblichen Zeitpunkten der Gülleausbringung auf Acker- und Grünlandflächen im Oktober 2002 (Serie 1), April 2003 (Serie 2) und September 2003 (Serie) ermöglichte hierbei die Berücksichtigung standort- und seasonspezifischer Einflussgrößen. Zu diesen zählten Unterschiede in der Bodenbeschaffenheit, die sich zum einen auf den Ackerplots durch die Gülleausbringung auf die Weizenstoppel unmittelbar nach der Ernte sowie auf die über Winter liegengelassene Grubberfurche ergaben. Ferner erfolgte auf 2 Kontrollplots die Intensivberegnung direkt nach Gülleausbringung, während auf den anderen Ackerplots die Gülle praxisüblich mittels Grubber auf 15 cm Bodentiefe eingearbeitet wurde. Zum anderen lagen in den Böden von Acker- und Grünlandflächen saisonbedingt unterschiedliche Wassergehalte vor, die die Infiltration von Beregnungswasser und den Oberflächenabfluss beeinflussten. So betragen in den Serien 1 bis 3 die Wassergehalte der obersten 0-5 cm-Bodenschicht auf der Grünlandfläche vor der Beregnung 14.5, 13.8 und 6.4 %, die nach der jeweiligen Beregnung auf durchschnittlich 22.9 % anstiegen. Für den Ackerboden betragen die korrespondierenden Werte 17.2, 15.6 und 13.3 % vor sowie 25.0 % nach der Beregnung.

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse wiederum für die untersuchten Sulfonamide, Benzimidazole und Ivermectin getrennt dargestellt. Dabei werden jeweils zuerst die oberflächlich abfließenden Volumina der Runoff-Austräge und die Mengen an erodiertem Sediment von den einzelnen Testplots aufgeführt, um zum einen die Unterschiede von parallel bearbeiteten Testplots, aber auch die von Serie zu Serie auftretenden Variabilitäten zu diskutieren. Zum anderen ermöglicht diese Differenzierung die Quantifizierung von Austrägen über die wässrige und die partikuläre Phase. Für alle Testsubstanzen werden zuerst die potentiellen Austräge nach der 2-stündigen Intensivberegnung vorgestellt. Dieser schließt sich die Diskussion der zeitaufgelösten, aktuellen Austräge in der beginnenden Intensivberegnung an, um hieraus eine Risikoabschätzung für diffuse Stoffeinträge in Oberflächengewässer abzuleiten.

## 5.1 Sulfonamide

Die Hauptaktivitäten in diesen Testplot-Serien fokussierten sich auf die vielfach in der Veterinärmedizin eingesetzten Sulfonamide Sulfadiazin und Sulfadimidin, die sowohl auf den Acker- und Grünlandplots untersucht wurden. Sulfamethoxazol wurde in diesen Testplot-Experimenten wie in den Labortests als weiteres Struktur analogon einbezogen, um hiermit den Katalog an Rückstandsdaten für diese Testsubstanz, die bereits im "Boden-Projekt" als Humanarzneimittel in Boden und Klärschlamm untersucht wurde, zu vervollständigen.

### 5.1.1 Abflüsse und Austräge von Ackerplots

#### Potentielle Austräge nach Intensivberechnung

Die Ausgangs- sowie die Gesamtaustragsituation für die im Oktober 2002, April 2003 und September 2003 durchgeführten Testplot-Serien auf der Ackerfläche im Untersuchungsgebiet Adenstedt wird in **Tab. 5.1** wiedergegeben. Die rückstandsanalytischen Untersuchungen der Testgülle zum Zeitpunkt der Gülleausbringung belegten, dass sich die anfangs in der Gülle eingestellten Sulfonamid-Konzentrationen entsprechend der jeweiligen Lagerungsdauer verminderten. Diese Ergebnisse stehen mit denen der Labortests in Einklang und lassen sich danach überwiegend auf die Festlegung der Sulfonamid-Rückstände in der Güllematrix zurückführen.

Wie bereits in Kap. 3.4 erläutert wurde, gab die zu den Testplot-Experimenten gleichzeitige betriebsbedingte Nutzung der Ackerfläche die Unterschiede in der Hangneigung, der Bodenbeschaffenheit und der Dauer der Güllelagerung als Randbedingungen vor. Bei der insgesamt festgestellten Variabilität der Runoff-bedingten Austräge lassen sich allerdings keine eindeutigen Abhängigkeiten zu einzelnen Randbedingungen aufzeigen. Das belegen bereits die von Serie zu Serie und teilweise von den Testplot-Parallelen ermittelten Volumina der aufgefangenen Runoff-Suspensionen, die in einem Bereich von 36-128 L lagen. So können die in Serie 3 für die 2 parallelen Testplot-Experimente mit Einarbeitung der Gülle ermittelten Abflüsse nur als kleinflächige Variabilitäten der häufig in Böden auftretenden Struktur- und Texturunterschiede interpretiert werden. Eine ähnliche Variabilität spiegelte die mit diesen Runoff-Suspensionen aufgefangenen Feststoffe mit 112-406 g wider.



**Tab. 5.1: Oberflächenabflüsse und Oberflächenausträge von Sulfonamiden von den Testplots der Ackerfläche nach Testgülle-Applikation, Bodenbearbeitung und Intensivberegnung**

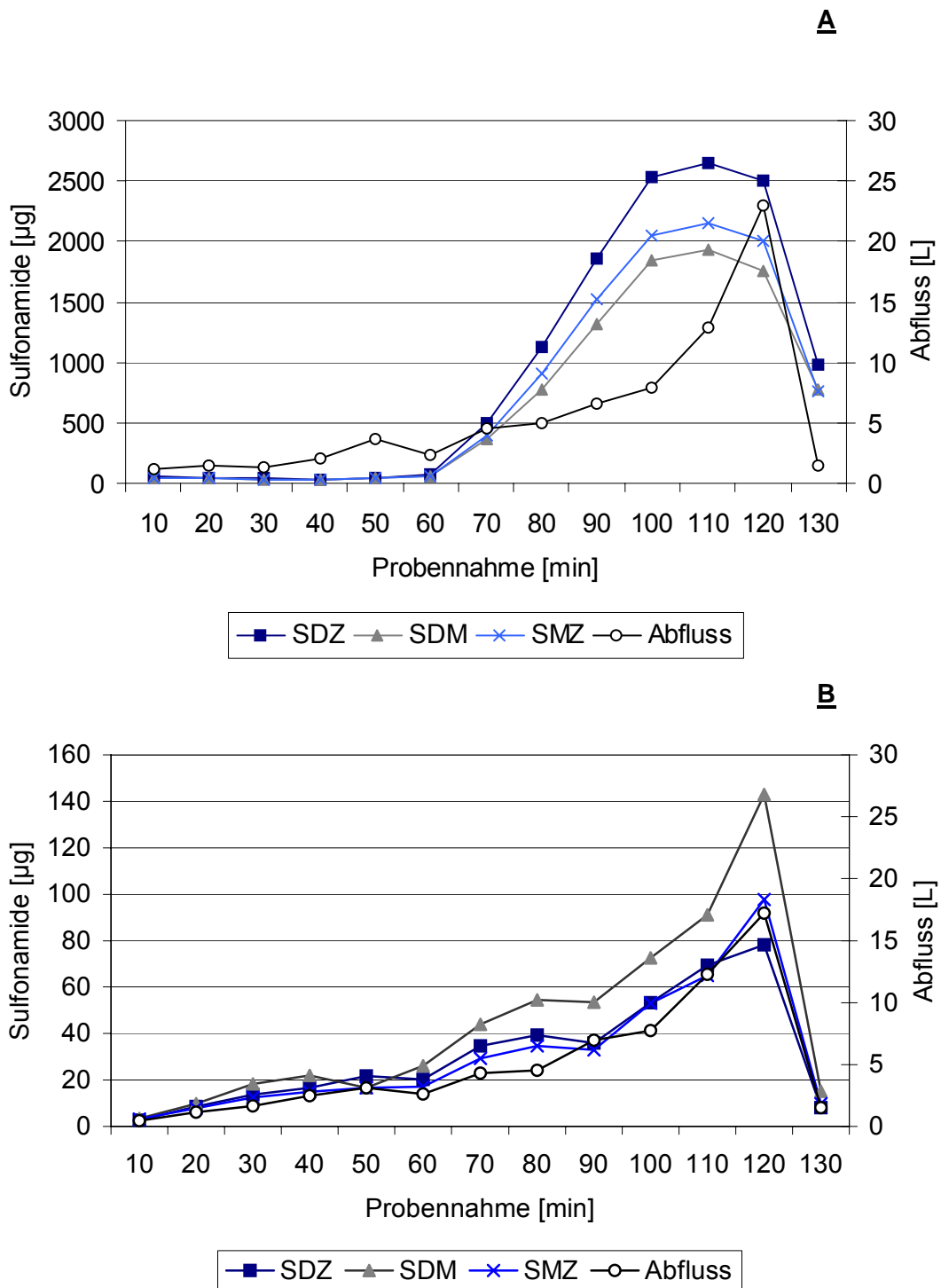
	Serie 1	Serie 2		Serie 3		
	Plot 1	Plot 1	Plot 2	Plot 1	Plot 2	Plot 3
<b>Einarbeitung</b>	mit <sup>a</sup>	mit <sup>b</sup>	mit <sup>b</sup>	mit <sup>b</sup>	mit <sup>b</sup>	ohne <sup>b</sup>
<b>Inklination [%]</b>	7.7	8.2	8.2	7.7	7.7	7.7
<b>Alterung [d]</b>	6	6	7	0	0	6
<b>Konzentrationen nach Güllelagerung</b> [g 20 kg <sup>-1</sup> ]						
Sulfadiazin	4.3	0.5	0.4	0.9	0.8	0.4
Sulfadimidin	6.5	0.7	0.4	1.0	---	---
Sulfamethoxazol	5.1	0.6	0.3	1.0	---	---
<b>Abfluss [L]</b>	36	73	66	99	128	57
<b>wässrige Austräge</b> [%]						
Sulfadiazin	1.2	2.5	0.1	0.1	0.2	0.8
Sulfadimidin	0.8	1.2	0.2	0.1	---	---
Sulfamethoxazol	0.9	1.6	0.2	0.1	---	---
<b>Feststoffe [g]</b>	112	406	301	386	206	268
<b>partikuläre Austräge</b> [%]						
Sulfadiazin	0.004	0.003	0.003	nd	nd	nd
Sulfadimidin	0.003	0.003	0.005	nd	---	---
Sulfamethoxazol	0.002	0.003	0.006	nd	---	---

a: Weizenstoppel; b: Grubberfurche; ---: nicht appliziert; nd: nicht detektiert

Die aus der 2-stündigen Intensivberegnung mit einer Beregnungsintensität von 50 mm h<sup>-1</sup> resultierenden Gesamtausträge an Sulfonamiden belegen ganz deutlich, dass die Substanzen vermehrt mit der wässrigen Phase ausgetragen werden. In Bezug auf die tatsächlich mit der Testgülle-Applikation in den Boden der Testplots eingebrachten Sulfonamid-Rückstände belaufen sich die wässrigen Emissionen auf 0.1 bis 2.5 %. Für diese wurde in Serie 2 auf den parallel bearbeiteten Testplots trotz annä-

hernd identischen Abflussvolumina von 73 und 66 L die größte Variabilität festgestellt. In Serie 3 dagegen ergaben sich trotz deutlich unterschiedlicher Abflussvolumina übereinstimmende Sulfonamid-Austräge. Die Resultate aus Serie 1 nehmen diesbezüglich eine Mittelstellung ein. Plot 3 aus Serie 3 stellt einen Kontrollplot dar, bei dem die Intensivberegnung unmittelbar nach der Testgülle-Applikation erfolgte. Hier lassen sich mit einer Sulfadiazin-Emission von 0.8 % gegenüber den Testplots dieser Serie mit Einarbeitung der Gülle in den Boden und dann erst einsetzender Beregnung leicht erhöhte Austräge konstatieren. Die sich in Serie 3 abzeichnende Tendenz höherer Sulfonamid-Austräge von einer nicht bearbeiteten Bodenoberfläche lässt sich aufgrund der in Serie 1 und 2 ermittelten Variabilitäten der Sulfonamid-Austräge nicht bestätigen. Diese traten dann in den Untersuchungen von der Grünlandfläche jedoch deutlich hervor. Im Gegensatz zu den wässerigen Austrägen waren die partikulären Austräge von untergeordneter Bedeutung. Auf letztere entfielen so maximal 0.006 % der tatsächlich mit der Testgülle in den Boden eingebrachten Applikationsmenge. Diese Ergebnisse spiegeln insgesamt die für Sulfonamide angegebenen Wasserlöslichkeiten von 8-1500 mg L<sup>-1</sup> wider (Thiele-Bruhn, 2003).

Diese in den Testplot-Serien 1 bis 3 für Sulfonamide ermittelten Ergebnisse stehen trotz unterschiedlicher Randbedingungen weitgehend in Einklang mit den Testplot-Experimenten von Kay et al. (2005), die den Oberflächenabfluss von Sulfachlorpyridazin und Oxytetracyclin von Weizenstoppelflächen mit und ohne Fahrspuren untersuchten. Dort wurden auf einem tonigen Lehm Testplots mit Hangneigungen von 5-7 % eingerichtet und die in Schweinegülle dotierten Testsubstanzen ohne Alterung der Rückstände ausgebracht, aber nicht in den Boden eingearbeitet. Die Beregnung von 15 mm wurde in den ersten 3 Tagen mit einer Rückenspritze simuliert. Danach wurde die Austragsituation für insgesamt 85 Tage nur noch durch Niederschlagsereignisse bestimmt. Für das untersuchte Sulfonamid ergaben sich wässerige Austräge von 0.4 % in der Fahrspur und von 0.1 % von der Stoppelfläche. Die partikulären Austräge von 0.01 bzw. 0.001 % spielten auch dort eine untergeordnete Rolle. Im Vergleich hierzu wurden für Oxytetracyclin niedrigere Austräge mit der wässerigen Phase, dagegen höhere mit der partikulären Phase ermittelt. Durch die Fahrrinne wurden 0.07 bzw. 0.03 %, über die Stoppelfläche dagegen nur 0.05 bzw. 0.004 % ausgetragen. Insgesamt verdeutlichten diese Werte die höhere Affinität von Oxytetracyclin zur Gülle- und Bodenmatrix.



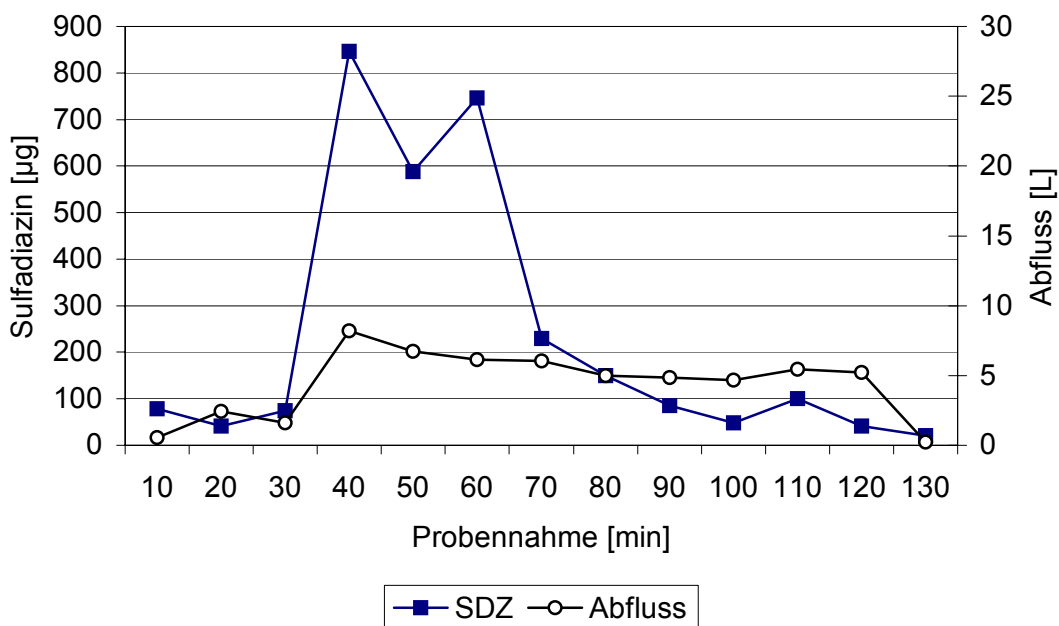
**Abb. 5.1: Oberflächenabflüsse und Oberflächenausträge der Sulfonamide von A: Plot 1 und B: Plot 2 der Ackerfläche in Serie 2 nach Testgülle-Applikation, Bodenbearbeitung und Intensivberegnung**

### **Zeitaufgelöste Austräge**

Neben der Betrachtung der Gesamtausträge ermöglichte die in 10 min-Intervallen erfolgte Probenahme der Runoff-Suspensionen auch die zeitaufgelöste Ermittlung der wässerigen Austräge während dieser 2-stündigen Intensivberegnung. In **Abb. 5.1** ist exemplarisch die Austragsituation der parallel in Serie 2 bearbeiteten Plots dargestellt. Aus dieser wird ersichtlich, dass von den Testplots erhöhte Abflüsse, mit denen auch die Sulfonamid-Austräge anstiegen, erst mit 60-minütiger Verzögerung auftraten. Zum Ende der Beregnungsperiode wurden dann die höchsten Werte erreicht, die in der Postrun-Periode rasch abfielen (Kreuzig et al., 2005b). Obgleich von den hier dargestellten Testplots bei annähernd identischen Abflussvolumina unterschiedlich hohe Gesamtausträge der Sulfonamide zu verzeichnen waren, spiegeln die jeweiligen Kurvenverläufe das beschriebene Abflussverhalten wider. Aufgrund der Variabilität der Sulfonamid-Austräge lassen sich hier auch keine stoffspezifischen Unterschiede ablesen.

Insgesamt ergab sich dieses Bild für alle Testplot-Serien von der Ackerfläche, bei denen die praxisübliche Einarbeitung der ausgebrachten Testgülle in den Boden der Intensivberegnung vorausging (Höltge, 2005). Diese Bodenbearbeitung fördert damit die Infiltration des Beregnungswassers bis in eine Bodentiefe von 10-15 cm. Erst nach weitgehender Wassersättigung der bearbeiteten Bodenschicht setzten Oberflächenabfluss und Oberflächenaustrag ein. Die für die Sulfonamide festgestellten Runoff-Austräge lassen sich damit als Resultat dieser 2-stündigen Intensivberegnung mit  $50 \text{ mm h}^{-1}$  bezeichnen. Unter Berücksichtigung der in der Düngeverordnung (1997) vorgegebenen Gülleeinarbeitung in den Boden lässt sich aus diesen Testplot-Experimenten für realistischere Starkregenereignisse von  $10 \text{ mm d}^{-1}$  kein relevantes Runoff-Risiko für Sulfonamid-Rückstände ableiten.

Der Einfluss der Bodenbearbeitung nach der Gülleausbringung lässt sich in dem Experiment auf Plot 3 in Serie 3 erkennen. In diesem schloss sich die Beregnung unmittelbar der Testgülle-Applikation an. In **Abb. 5.2** ist ersichtlich, dass hier mit dem Anstieg des Abflusses auch die hauptsächlichen Austräge an Sulfadiazin erfolgen. Diese belaufen sich in dem 30-70 min-Zeitfenster der Intensivberegnung auf 0.6 % der tatsächlich mit der Testgülle ausgebrachten Rückstandskonzentration und damit auf 75 % der Gesamtausträge nach 2-stündiger Intensivberegnung.



**Abb. 5.2: Oberflächenabfluss und Oberflächenaustrag von Sulfadiazin vom Testplot der Ackerfläche in Serie 3 nach Testgülle-Applikation und direkt anschließender Intensivberegnung**

### 5.1.2 Abflüsse und Austräge von Grünlandplots

#### Potentielle Austräge nach Intensivberegnung

Für die Testplot-Experimente von der Grünlandfläche ergab sich bei annähernd identischen Randbedingungen in den Serien 1 und 2 eine noch ausgeprägtere Austrags-situation, als sich dies von der Ackerfläche ohne Einarbeitung der Gülle bereits abzeichnete. Auffällig waren hier die mit 181 und 252 L deutlich höheren Abflussvolumina. Unmittelbar nach der Beregnung entnommene Bodenproben belegten eine Eindringtiefe des infiltrierten Beregnungswassers von nur 5 cm. Hieraus konnte gefolgert werden, dass die durch die Grasnarbe verdichtete Bodenoberfläche eher der Infiltration entgegenwirkt und den Oberflächenabfluss fördert. Mit diesen höheren Abflussvolumina gingen auch im Vergleich zu den Ackerplots deutlich höhere Sulfonamid-Austräge einher. Von den mit der Testgülle applizierten Sulfonamid-Rückständen wurden so mit dem Oberflächenabfluss nach 2-stündiger Intensivberegnung 13.3-27.6 % ausgetragen (Tab. 5.2).

**Tab. 5.2: Oberflächenabflüsse und Oberflächenausträge von Sulfonamiden von den Testplots der Grünlandfläche nach Testgülle-Applikation und Intensivberegnung**

	<b>Serie 1</b>	<b>Serie 2</b>	<b>Serie 3</b>
<b>Einarbeitung</b>	ohne	ohne	ohne
<b>Inklination [%]</b>	9.0	9.0	9.0
<b>Alterung [d]</b>	9	9	9
<b>Konzentrationen nach Güllelagerung [g 20 kg<sup>-1</sup>]</b>			
Sulfadiazin	4.2	0.2	0.4
Sulfadimidin	4.1	0.4	---
Sulfamethoxazol	5.3	0.3	---
<b>Abfluss [L]</b>	181	252	106
<b>wässrige Austräge [%]</b>			
Sulfadiazin	17.9	27.6	14.4
Sulfadimidin	27.4	15.8	---
Sulfamethoxazol	15.5	13.3	---
<b>Feststoffe [g]</b>	83	64	491
<b>partikuläre Austräge [%]</b>			
Sulfadiazin	0.04	0.002	0.02
Sulfadimidin	0.05	0.001	---
Sulfamethoxazol	0.03	0.001	---

---: nicht appliziert

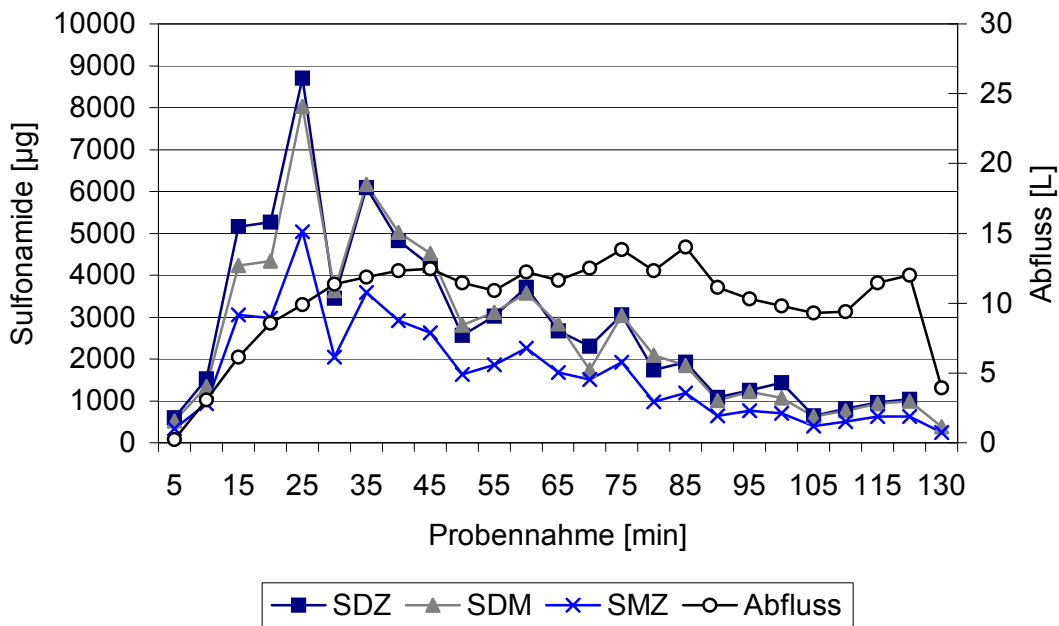
In Serie 3 lag zu Beginn des Testplot-Experimentes infolge des trockenen Sommers 2003 mit 6.4 % die niedrigste Bodenfeuchte vor. Mit dieser ging das niedrigste Abflussvolumen von 106 L, begleitet von dem höchsten partikulären Austrag von 491 g, einher. Von der mit der Testgülle applizierten Sulfadiazin-Konzentration wurden insgesamt 14.4 % abgeschwemmt. Insbesondere in den ersten Runoff-Proben konnte ein intensi-

ver Güllegeruch wahrgenommen werden, der anzeigte, dass mit der einsetzenden Intensivberegnung Gülle oberflächlich abgeschwemmt und über diesen Austragspfad das applizierte Sulfonamid ausgetragen wurde.

Die in den 3 Testplot-Serien ermittelten Sulfonamid-Austräge von güllegedüngten Grünlandplots fallen mit 13.3-27.6 % deutlich höher aus, als diese für die Testplot-Experimente von Burkhardt et al. (2005) beschrieben werden. Dort ergeben sich nach Ausbringung von Schweinegülle aus der Intensivtierhaltung, die 11 mg Sulfadimidin  $\text{kg}^{-1}$  Gülle enthielt und zusätzlich mit Sulfadiazin und Sulfathiazol in einer Konzentration von jeweils 50 mg  $\text{kg}^{-1}$  dotiert wurde, und nach Beregnung maximale Austräge von 2.1 %. Zu berücksichtigen sind in beiden Testplot-Studien deutlich von einander abweichende Randbedingungen. Auch wenn die Konzentrationen der im Gemisch dotierten Testsubstanzen in beiden Untersuchungen übereinstimmen, können unterschiedliche Einflüsse durch die applizierte Schweingülle gegenüber der im "Runoff-Projekt" verwendeten Rindergülle begründet sein. Weitere Unterschiede betreffen die Beregnung, die bei Burkhardt et al. (2005) erst nach einer 1-3-tägigen Kontaktzeit der Gülle mit der Bodenoberfläche mit einer niedrigeren Intensität von  $20 \text{ mm h}^{-1}$  in 1.5 h einsetzt. Auch wenn dort nach 3-tägiger Kontaktzeit die geringfügig höheren Austräge konstatiert werden, kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass in dieser Zeit die Affinität von Sulfonamiden zu Bodenmatrizes nach Testgülle-Applikation bereits ihre Mobilität verringern. Dieser Aspekt ist eindeutig aus den Labortests zum Abbau von Sulfadiazin in güllegedüngten Böden abzuleiten (Kreuzig und Höltge, 2005, Höltge, 2005). Ferner unterscheiden sich Bodentypen und Bodenarten beider Untersuchungsgebiete. So standen dort eine Braunerde mit einem schwach sandigem Lehm (23 % Ton, 3.6 %  $C_{\text{org}}$ , pH 5.7) der Parabraunerde mit dem schluffigen Ton (39 % Ton, 3.0 %  $C_{\text{org}}$ , pH 4.5) des "Runoff-Projektes" gegenüber. Unterschiede liegen auch in den Bodenwassergehalten vor Beregnung vor. Während bei Burkhardt et al. (2005) aufgrund vorausgehender Niederschläge bereits vor der Beregnung die Feldkapazität annähernd erreicht wurde, wurde diese im "Runoff-Projekt" selbst nach der Intensivberegnung noch deutlich unterschritten.

Insgesamt gibt die Gegenüberstellung dieser 3 von unterschiedlichen Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Untersuchungsgebieten durchgeführten Runoff-Studien die Variationsbreite von Oberflächenausträgen wieder, die auf Unterschieden im experimentellen Design und in den standortspezifischen Randbedingungen zurückzuführen sind. Zur Ermittlung von Emissionsfaktoren ist hier eine weitergehende Vereinheitlichung

und die Einbeziehung weiterer Veterinärpharmaka erforderlich. Letzteres erfolgte im "Runoff-Projekt" bereits ansatzweise für Benzimidazole und Ivermectin (s. Kap. 5.2, 5.3).



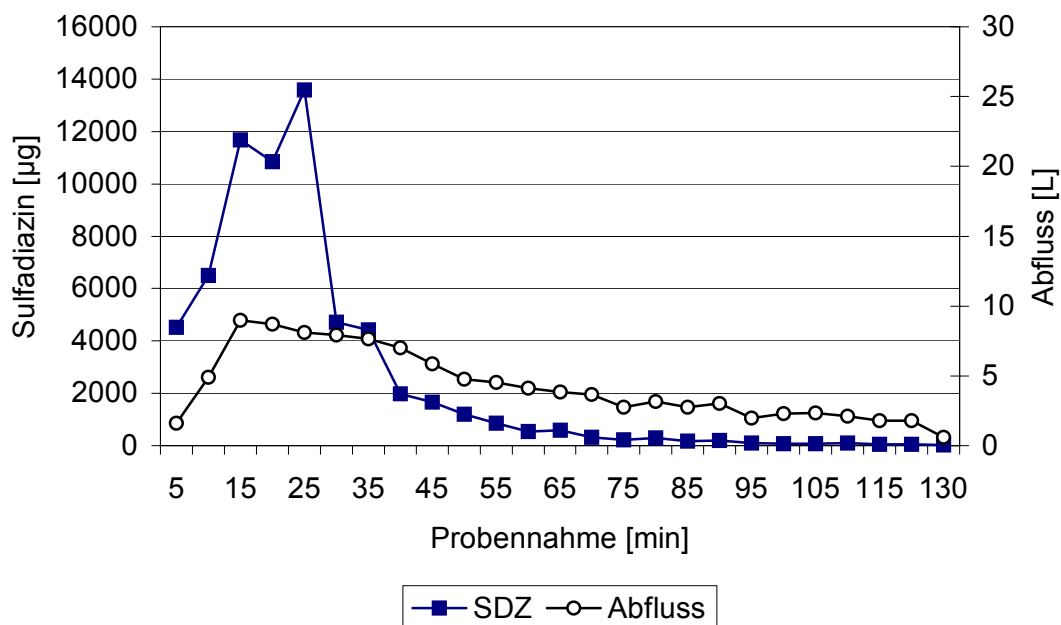
**Abb. 5.3: Oberflächenabflüsse und Oberflächenausträge der Sulfonamide von der Grünlandfläche in Serie 2 nach Testgülle-Applikation und Intensivberegnung**

#### Zeitaufgelöste Austräge

Die Probenahme der Runoff-Suspensionen von den Grünlandplots in 5 min-Intervallen ermöglichte die Darstellung zeitaufgelöster Abflusskurven, aus denen die Unterschiede der Runoff-Austräge von güllegedüngten Ackerplots mit und ohne Einarbeitung sowie von den Grünlandplots deutlich hervorgehen. Wie in **Abb. 5.3** zu erkennen ist, steigt der Oberflächenabfluss mit einsetzender Intensivberegnung innerhalb von 35 min langsam an, um bis zum Ende der Beregnungsperiode annähernd konstant zu bleiben. In diesem Zeitfenster treten auch die hauptsächlichen Sulfonamid-Emissionen auf. Während der ersten 20 min der Beregnungsperiode, die einen realistischen Niederschlag von 17 mm repräsentieren, werden in Serie 2 durchschnittlich 4 % der mit der Testgülle applizierten Sulfonamide ausgetragen. In **Abb. 5.4** wird die Austragsituation nach



dem trockenen Sommer 2003 dargestellt. Bei einem geringeren Bodenwassergehalt von nur 6.4 % gegenüber 13.8 bzw. 14.5 % in Serie 2 und 1 wurde mit beginnender Beregnung bereits die applizierte Testgülle oberflächlich abgeschwemmt, so dass damit in den ersten 20 min die Austräge für Sulfadiazin auf 8 % anstiegen; in Serie 1 betragen die durchschnittlichen Sulfonamid-Austräge in diesem 20 min-Fenster 9 %. Nach dem Erreichen der Maxima für Oberflächenabfluss und Sulfadiazin-Emissionen fielen beide Kurvenverläufe rasch ab. Mit dieser Gegenüberstellung der Austragsituationen von den Grünlandplots in Serie 2 und 3 wird noch einmal der Einfluss von seasonspezifischen Randbedingungen auf die Runoff-Ergebnisse deutlich.



**Abb. 5.4: Oberflächenabflüsse und Oberflächenausträge von Sulfadiazin von der Grünlandfläche in Serie 3 nach Testgülle-Applikation und Intensivberegnung**

## 5.2 Benzimidazole und Ivermectin

### Potentielle Austräge nach Intensivberegnung

Die Benzimidazol-Antiparasitika Flubendazol und Fenbendazol sowie das Makrolid-Antiparasitikum Ivermectin wurden in die 3 Testplot-Serien zum Runoff von der Ackerfläche einbezogen. Die Ergebnisse zu den potentiellen Austrägen nach der 2-stündigen Intensivberegnung sind in **Tab. 5.3** aufgeführt. Wie sich bereits aus den Stabilitätstests in Schweinegülle unter Laborbedingungen herausstellte, unterlagen diese Testsubstanzen während der kurzfristigen Güllelage nur einem langsamen Abbau. Somit nahmen die Konzentrationen von der Dotierung der Gülle bis zum Zeitpunkt der Testgülle-Ausbringung nur geringfügig ab.

Bezüglich der Abflussvolumina und der partikulären Austräge werden wiederum Variabilitäten offensichtlich, wie sie auch in den Untersuchungen mit Sulfonamiden festgestellt wurden. So wurden hier Runoff-Suspensionen von 7-130 L aufgefangen, die 79-829 g Feststoffe beinhalteten. Besonders auffallend war der Abfluss von Plot 2 aus Serie 1 von nur 7 L Runoff-Suspension. Auch nach Abbau des Schwenkdüsenregners konnten für den niedrigsten Abflusswert aller Testplot-Experimente keine Ursachen, wie z.B. "by-pass flow" entlang der Leitbleche oder durch Schrumpfungsrisse, festgestellt werden. Die mit  $< 0.001$  % quantifizierten Benzimidazol-Austräge mit der wässrigen Phase geben zwar die Größenordnung der anderen Experimente wieder, lassen sich aber insgesamt nur schwer in die Ergebnisinterpretation einbeziehen.

Von Interesse für die Austräge von Flubendazol ist der Vergleich der Austragsituation von den Testplots ohne und mit Einarbeitung der Testgülle. Die Intensivberegnung der unmittelbar zuvor güllengelegten Weizenstoppelfläche von Plot 1 in Serie 1 führte so zu Flubendazol-Austrägen von 0.01 % mit der wässrigen und 0.002 % mit der partikulären Phase. Nach der Einarbeitung in Serie 2 und 3 erfolgten die höheren Austräge von Flubendazol sowie Fenbendazol über den partikelassoziierten Transport. Dadurch wird die Affinität beider Benzimidazole zur Bodenmatrix betont, auf die auch schon die hohen  $K_{OC}$ -Werte im schluffigen Tonboden von  $8813 \text{ L kg}^{-1}$  für Flubendazol und  $3938 \text{ L kg}^{-1}$  für Fenbendazol hindeuteten. Die Gesamtausträge nach dieser 2-stündigen Intensivberegnung sind im Vergleich zu den Sulfonamiden (Kreuzig et al., 2005b) deutlich niedriger und bewegen sich in der Größenordnung der von Kay et al. (2005) ermittelten Austräge von Oxytetracyclin. Unter der Berücksichtigung, dass in diesen Testplot-Experimenten beide Benzimidazole in deutlich überhöhten Konzentrationen ausge-

bracht wurden, wie sie in Gülle aus der Intensivtierhaltung auch unter realistischen "worst case"-Bedingungen nicht erreicht werden (s. Kap. 2.1), lässt sich insbesondere nach praxisüblicher Einarbeitung der Gülle auf Ackerflächen aus diesen Emissionen kein relevantes Runoff-Risiko ableiten.

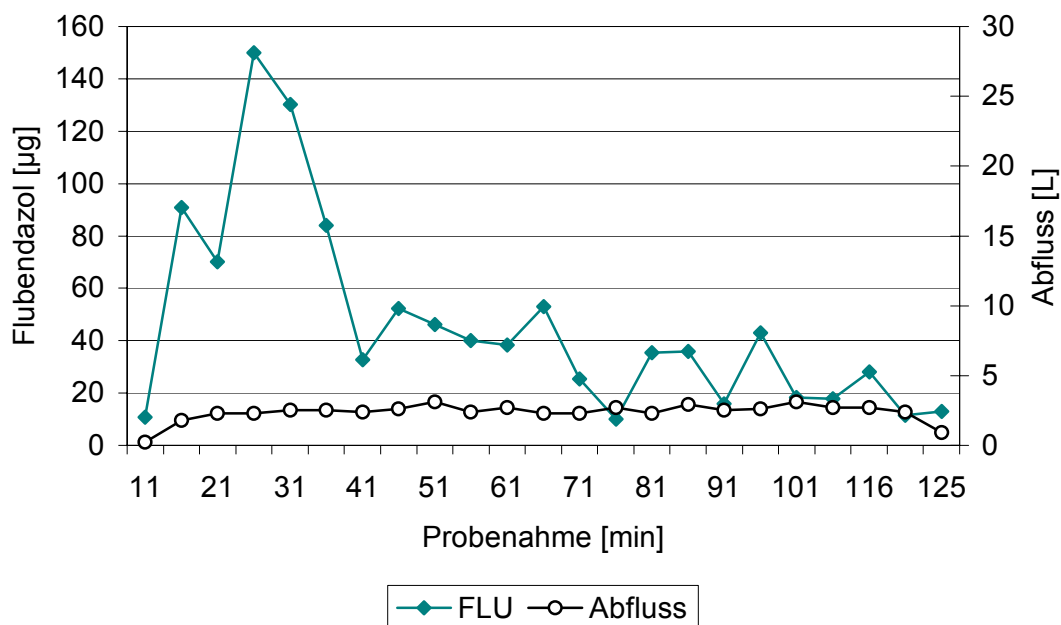
**Tab. 5.3: Antiparasitika-Austräge von Ackerplots nach Testgülle-Applikation, ohne bzw. mit Einarbeitung und Intensivberegnung**

	Serie 1		Serie 2	Serie 3
<b>Einarbeitung</b>	ohne <sup>a</sup>	mit <sup>a</sup>	mit <sup>b</sup>	mit <sup>b</sup>
<b>Inklination</b> [%]	7.7	9.0	8.8	9.2
<b>Alterung</b> [d]	6	1	7 (7) <sup>#</sup>	7 (7) <sup>#</sup>
<b>Konzentrationen nach Güllelagerung</b> [g 20 kg <sup>-1</sup> ]				
Flubendazol	8.5	8.5	0.8	1.0
Fenbendazol	---	7.5	0.7	0.8
<i>Ivermectin</i> <sup>#</sup>	---	---	1.1	1.1
<b>Abfluss</b> [L]	57	7	130 (87) <sup>#</sup>	49 (55) <sup>#</sup>
<b>wässrige Austräge</b> [%]				
Flubendazol	0.01	< 0.001	0.009	< 0.001
Fenbendazol	---	< 0.001	0.003	< 0.001
<i>Ivermectin</i> <sup>#</sup>	---	---	0.2	0.04
<b>Feststoffe</b> [g]	79	nd	417 (340) <sup>#</sup>	344 (829) <sup>#</sup>
<b>partikuläre Austräge</b> [%]				
Flubendazol	0.002	nd	0.05	0.01
Fenbendazol	---	nd	0.06	0.02
<i>Ivermectin</i> <sup>#</sup>	---	---	0.01	0.02

<sup>a</sup> Weizenstoppel, <sup>b</sup> Grubberfurche, ---: nicht appliziert, **nd**: nicht detektierbar

<sup>#</sup> *kursiv*: Daten aus Testplot-Experimenten mit *Ivermectin*

Ivermectin nimmt bezüglich der potentiellen Austräge nach 2-stündiger Intensivberegnung zwischen den Sulfonamiden und den Benzimidazolen eine Mittelstellung ein. In den Testplot-Experimenten in Serie 2 und 3 wurde mit der wässrigen Phase durchschnittlich 0.1 % der Ausbringungsmenge ausgetragen. Damit waren diese insgesamt niedriger als die Sulfonamid-Austräge, aber deutlich höher als die der Benzimidazole. Die partikelassoziierten Ivermectin-Austräge, die nur 0.02 % der Ausbringungsmenge betragen, entsprachen denen der Benzimidazole, waren aber deutlich niedriger als die der Sulfonamide. Diese Ergebnisgegenüberstellung verdeutlicht die substanzspezifischen Einflüsse auf die Oberflächenausträge.



**Abb. 5.5: Oberflächenabfluss und Oberflächenaustrag von Flubendazol vom Plot 1 der Ackerfläche in Serie 1 nach Testgülle-Applikation und direkt anschließender Intensivberegnung**

### Zeitaufgelöste Austräge

Aufgrund der hohen Ausbringungsmenge an Flubendazol konnte in Serie 1 von Plot 1 eine zeitaufgelöste Austragskurve aufgenommen werden (**Abb. 5.5**). Ohne Einarbeitung der Gülle in den Boden erfolgten die höchsten Austräge in einem Zeitfenster von 10-40 min nach Beginn der Intensivberegnung. Danach nahmen diese bei einer annä-

hernd konstant verlaufenden Abflusskurve ab, um dann in der Postrun-Periode die niedrigsten Werte einzunehmen. Damit stimmt diese zeitaufgelöste Austragsituation bei allerdings deutlich niedrigeren Gesamtausträgen mit der aus den entsprechenden Experimenten mit den Sulfonamiden von dem unbearbeiteten Ackerplot sowie den Grünlandplots weitgehend überein.

Nach Herabsetzen der Ausbringungsmenge von 500 mg auf 50 mg kg<sup>-1</sup> Schweinegülle und nach Einarbeitung der Testgülle waren die Benzimidazol-Emissionen von den Testplots in Serie 2 und 3 bereits zu niedrig, um in 10 min-Intervallen aufgelöste Austragskurven aufzunehmen. Deswegen wurden die Einzelproben zu 30 bzw. 60 min-Mischproben vereinigt. Die Ergebnisse sind in **Tab. 5.4** aufgelistet. Es zeigte sich wiederum, dass die hauptsächlichen Austräge erst mit voranschreitender Dauer der Intensivberegnung auftraten. Hiermit wird noch einmal die Zweckmäßigkeit der Düngeverordnung (1997) unterstrichen, nach der die Gülle zeitnah zur Ausbringung in den Boden von Ackerflächen einzuarbeiten ist. Auf diese Weise lassen sich nicht nur die Emissionen geruchsintensiver und klimarelevanter Gase, sondern auch das Runoff-Risiko auf hanggeneigten Ackerflächen minimieren.

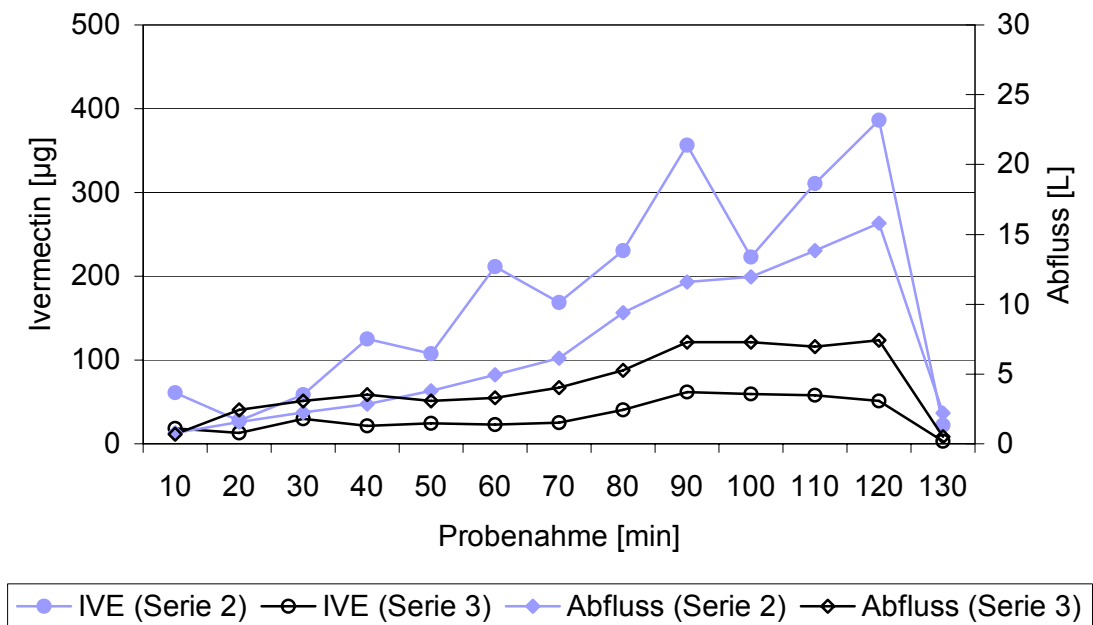
**Tab. 5.4: Oberflächenausträge von Flubendazol (FLU) und Fenbendazol (FEN) von Ackerplots nach Testgülle-Applikation, Einarbeitung und Intensivberegnung**

	Serie 2			Serie 3		
Intervall [min]	Abfluss [L]	FLU [µg]	FEN [µg]	Abfluss [L]	FLU [µg]	FEN [µg]
30	4	1.3	1.1	---	---	---
60	13	10.6	3.9	18	1.7	1.4
90	42	32.0	7.4	---	---	---
130	72	33.3	8.4	30	1.4	2.5

---: nicht detektierbar

Die Probenahme in 10 min-Intervallen führte für die Ivermectin-Austräge mit der wässrigen Phase zu Austragskurven (**Abb. 5.6**), die auch für die anderen untersuchten

Testsubstanzen von den Ackerplots nach Einarbeitung der Gülle und Intensivberegnung aufgezeichnet wurden. So stiegen in beiden Serien erst nach 1-stündiger Beregnung die Abflüsse und die Oberflächenausträge an. Beide erreichten dann zum Beregnungsende die höchsten Werte und fielen in der Postrun-Periode rasch ab. Auch hier sind die Gesamtausträge als ein Resultat dieser Intensivberegnung anzusehen, aus dem auch unter Berücksichtigung der in Gülle aus der Intensivtierhaltung nachgewiesenen Rückstandskonzentrationen kein relevantes Runoff-Risiko von bearbeiteten Ackerflächen abzuleiten ist.



**Abb. 5.6: Oberflächenabflüsse und Oberflächenausträge von Ivermectin (IVE) von Ackerplots in Serie 2 und Serie 3 nach Testgülle-Applikation, Einarbeitung und Intensivberegnung**

## **6. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen**

In der Intensivtierhaltung eingesetzte Veterinärpharmaka werden von den behandelten Nutztieren als unveränderte Ausgangsverbindungen oder Metaboliten ausgeschieden und gelangen in die Gülle. Die Anwendung dieses Wirtschaftsdüngers stellt damit den Eintragspfad für Veterinärpharmaka-Rückstände in Böden dar. In diesem komplexen Umweltkompartiment fungieren Abbau und Sorption als konzentrationsbestimmende Prozesse und entscheiden damit über die Verlagerbarkeit von Rückständen mit dem perkolierenden Sickerwasser in den Unterboden bis ggf. ins Grundwasser oder mit dem Oberflächenabfluss (Runoff) in Oberflächengewässer. Während für Pflanzenschutzmittel der Oberflächenabfluss nach Starkregenereignissen als ein diffuser Eintragspfad in Oberflächengewässer eindeutig identifiziert wurde, fehlten solche Untersuchungen für Veterinärpharmaka bei Beginn dieses vom Umweltbundesamt geförderten Forschungsvorhabens "Untersuchungen zum Abflussverhalten von Veterinärpharmaka bei Ausbringung von Gülle auf Ackerland und Weide" (kurz: Runoff-Projekt; FKZ 202 67 435) im April 2002.

Aufgrund des für Veterinärpharmaka spezifischen Eintragspfades in Böden ist die Austragsituation aus diesem Umweltkompartiment prinzipiell vom Rückstandsverhalten dieser Substanzen in Gülle und Boden abhängig. Deswegen wurde in diesem Runoff-Projekt die eigentliche Testplot-Studie durch ein mehrstufiges Versuchsdesign von Labortests ergänzt, um auf dieser Grundlage die Ergebnisse zum Abfluss- und Rückstandsverhalten unter Freilandbedingungen bewerten zu können. Damit stellte das Runoff-Projekt auch die konsequente Fortführung des ebenfalls vom Umweltbundesamt geförderten und im Institut für Ökologische Chemie und Abfallanalytik, Technische Universität Braunschweig, zeitnah bearbeiteten Forschungsvorhabens "Verhalten von in der Umwelt vorkommender Pharmaka und ihren Metaboliten in Modelltestsystemen – Teil 2: Modellsystem Boden" (kurz: Boden-Projekt, FKZ 20167401/02; Kreuzig et al. 2005a) dar, so dass nun zum Rückstandsverhalten von Human- und Veterinärpharmaka in Böden eine breitere Datenbasis vorliegt.

### **Experimentelles Design**

Im Fokus der Laboruntersuchungen standen Tests zur Stabilität von Veterinärpharmaka in Gülle, die schließlich die Relevanz dieses Eintragspfades in Böden bestimmt. Auf der Basis dieser Stabilitätstests wurde Testgülle mit kurzfristig gealterten Veterinär-

pharmaka-Rückständen hergestellt und in den Labortestsystemen eingesetzt. Neben den Ansätzen, in denen die Testsubstanzen konventionell als Standardlösungen appliziert wurden (**Standard-Applikation**), ermöglichte in diesem neuen Versuchsdesign die **Testgülle-Applikation** die Untersuchung des Abbau- und Sorptionsverhaltens unter dem Einfluss verschiedener Güllematrixes. Damit konnte bereits der für Veterinärpharmaka spezifische Eintragspfad unter Laborbedingungen berücksichtigt und damit zur Bewertung der in den Testplot-Experimenten erarbeiteten Ergebnisse unter Freilandbedingungen herangezogen werden.

In den Labortestsystemen wurden als ausgewählte pharmazeutische Testsubstanzen die strukturanalogen Sulfonamide **Sulfadiazin** und **Sulfamethoxazol** und sein korrespondierender Metabolit **Acetyl-Sulfamethoxazol** sowie die strukturanalogen Benzimidazole **Flubendazol** und **Fenbendazol** als  $^{14}\text{C}$ -markierte Radiotracer eingesetzt, um ihr Verhalten und ihren Verbleib in den Gülle- und Bodenmatrixes unter Berücksichtigung der Mineralisation sowie der Bildung extrahierbarer und nicht-extrahierbarer Rückstände zu bilanzieren. In den Extrakten wurde darüber hinaus ein Metaboliten-Screening zur Differenzierung zwischen applizierter Ausgangsverbindung und gebildeten Metaboliten vorgenommen. Da das Makrolid-Antiparasitikum **Ivermectin** nicht als Radiotracer zur Verfügung stand, wurden die Labortests rückstandsanalytisch begleitet. Für die Testplot-Experimente wurde das Spektrum der Testsubstanzen noch um das Sulfonamid **Sulfadimidin** erweitert.

Für Langzeittests über 102 Tage zum mikrobiellen Abbau sowie Kurzzeittests über 3 Tage zum mikrobiellen, chemischen und photoinduzierten Abbau der ausgewählten Testsubstanzen wurden Proben eines schluffigen Tonbodens und eines schluffigen Sandbodens eingesetzt. In Batch-Equilibrium-Tests wurden ferner Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten ( $K_d$ ,  $K_{OC}$ -Werte) ermittelt, um hieraus Mobilitätstendenzen der Testsubstanzen in Böden abzuleiten. Für  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin schlossen sich Laborlysimetertests an, um die Verlagerung in den ungestörten Bodenmonolithen unter ungesättigtem Wasserfluss und unter dem Einfluss der Testgülle-Applikation zu studieren. Daneben wurden weitere Tests zur chemischen und biologischen Charakterisierung der in den Böden gebildeten nicht-extrahierbaren Rückstände durchgeführt, um damit den Fragen nach Bindungsstärke und Remobilisierung unter geänderten Milieubedingungen nachzugehen. Schließlich wurden ökotoxikologische Wirkungen der Veterinärpharmaka auf verschiedene Testspezies in terrestrischen und aquatischen Systemen getestet.



In den 3 Testplot-Serien im Oktober 2002 (Serie 1), April 2003 (Serie 2) und September 2003 (Serie 3) folgte dann die eigentliche Runoff-Studie, in der das Abflussverhalten der Testsubstanzen von güllegedüngten Acker- und Grünlandflächen nach Intensivberegnung unter dem Einfluß standort- und seasonspezifischer Unterschiede untersucht wurde. Schlußendlich wurden diese Testplot-Experimente genutzt, um das Rückstandsverhalten der Testsubstanzen in güllegedüngten Böden unter Freilandbedingungen in einem Zeitraum von 50-663 Tagen zu ermitteln.

### **Rückstandsverhalten der Testsubstanzen**

In den Stabilitätstests von <sup>14</sup>C-Sulfadiazin, <sup>14</sup>C-Sulfamethoxazol und <sup>14</sup>C-Acetyl-Sulfamethoxazol in Rindergülle lag bereits 7 Tage nach Standard-Applikation der Hauptanteil der Radioaktivität in Form nicht-extrahierbarer Rückstände vor. Nach 102 Tagen war die Mineralisation stets < 2 % der anfangs eingesetzten Radioaktivität. In exemplarisch durchgeführten Untersuchungen zur Stabilität von <sup>14</sup>C-Sulfadiazin in Schweinegülle ergab sich hingegen eine Verschiebung der Bilanzen zugunsten der <sup>14</sup>C-Kohlendioxid-Freisetzung (18 %) und der extrahierbaren Fraktion, die bis zum Abschluss der Untersuchungen nach 101 Tagen überwiegend durch die unveränderte Ausgangsverbindung dominiert wurde.

Die Rückstandsdynamik der strukturanalogen Sulfonamide wurde nach Standard-Applikation im schluffigen Ton und im schluffigen Sand ebenfalls überwiegend durch die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände dominiert. Die Mineralisation war von untergeordneter Bedeutung. Die Anlagerung an die Matrix wurde durch die Testgülle-Applikation noch beschleunigt. Bereits zu Testbeginn lag der Anteil nicht-extrahierbarer Rückstände für die untersuchten Sulfonamide bei durchschnittlich 80 %. Somit sind für die Sulfonamide mit einer Mineralisation < 5 % sowie der Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände > 70 % in 100 Tagen die im Rahmen der Pflanzenschutzmittel-Zulassung definierten Persistenzkriterien erfüllt. Darüber hinaus konnte für <sup>14</sup>C-Acetyl-Sulfamethoxazol in diesen Batchexperimenten die hydrolytische Umwandlung in <sup>14</sup>C-Sulfamethoxazol eindeutig belegt werden.

In den Kurzzeittests zur chemischen Charakterisierung der nicht-extrahierbaren Rückstände konnten noch ca. 30 % der im ersten Schritt mit Ethylacetat nicht-extrahierten Radioaktivität aus den Tag-102-Proben freigesetzt werden, indem die Extraktionsrückstände sequentiell mit salzsaurem Methanol und Chlortrimethylsilan nachbehandelt wurden. In der letzten Fraktion entfielen schließlich noch 3 % auf <sup>14</sup>C-Sulfadiazin als

unveränderte Ausgangsverbindung. Insgesamt zeigte sich hier eine hohe Affinität der  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin-Rückstände zur Bodenmatrix, die sich auch im Belebtschlamm-, *Brassica rapa*- und den *Lumbricus terrestris*-Tests A und B zur Remobilisierung bzw. zur Immobilisierung widerspiegelte und unter dem Einfluß der Testgülle sich sogar noch erhöhte. Um die Bewertung der Umweltrelevanz dieser nicht-extrahierbaren Sulfonamid-Rückstände zu vervollständigen, müßten sich noch Langzeituntersuchungen unter Labor-, aber auch unter Freilandbedingungen anschließen.

Wie in den Kurzzeittests zum mikrobiellen und photoinduziert-mikrobiellen Abbau wurden auch in den Proben zum chemischen Abbau nicht-extrahierbare Rückstände gebildet, so dass ein ausschließlicher Einfluss der Mikroorganismen auf die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände nicht gegeben war. Das Metaboliten-Screening zeigte allerdings die Unterschiede zu den Ansätzen mit mikrobiell aktiven Bodenproben. Während in den Proben zum mikrobiellen Abbau in den Ethylacetat-Extrakten Umwandlungsprodukte nachweisbar waren, konnten in den für die Untersuchungen zum chemischen Abbau erhaltenen Extrakten hauptsächlich  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin,  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol bzw.  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol als unveränderte Ausgangsverbindungen detektiert werden. Photoinduzierte Einflüsse wirkten sich insgesamt auf die Rückstandsdynamik nur wenig aus.

Die ermittelten Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten ( $K_d$ -Werte) wiesen für  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin,  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol und  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol nach Standard-Applikation mit 1.3 bis 2.1  $\text{L kg}^{-1}$  eine mäßige Mobilität aus. Während nach Testgülle-Applikation für  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin- und  $^{14}\text{C}$ -Sulfamethoxazol-Rückstände mit  $K_d$ -Werten  $> 10 \text{ L kg}^{-1}$  eine stärkere Sorption zu verzeichnen war, ergab sich für  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Sulfamethoxazol-Rückstände mit 2  $\text{L kg}^{-1}$  ein der Standard-Applikation entsprechender Wert. In den für  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin durchgeführten Laborlysimetertests zeigte sich entsprechend den ermittelten Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten nach Testgülle-Applikation lediglich eine geringe Verlagerungstendenz. So konnten 5 % der Ausgangsaktivität im Perkolat nachgewiesen werden, die 3 % des anfangs applizierten  $^{14}\text{C}$ -Sulfadiazin enthielten.

Den Resultaten der Laborexperimente entsprechende Ergebnisse wurden auch für das Abbauverhalten der eingesetzten Sulfonamide im Boden unter Freilandbedingungen festgestellt. So war für **Sulfadiazin**, **Sulfadimidin** und **Sulfamethoxazol** in allen 3 Testplot-Serien in der 0-15 cm-Bodenschicht der Ackerplots eine schnelle Konzentrationsabnahme auf Werte im Bereich der Bestimmungsgrenze von  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  zu beob-

achten. Eine Verlagerung in den Unterboden konnte dagegen nicht nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den Sulfonamiden konnten in den in Schweinegülle durchgeführten Stabilitätstests der Benzimidazole der Hauptanteil der eingesetzten Radioaktivität als unveränderte Ausgangsverbindungen in der extrahierbaren Fraktion nachgewiesen werden. In den Tag-102–Proben betragen diese Anteile für <sup>14</sup>C-**Flubendazol** und <sup>14</sup>C-**Fenbendazol** 72 bzw. 80 %. Letzteres wurde dabei in den Extrakten von seinem primären Metaboliten Oxfendazol (5 %) begleitet. Auf die Mineralisation entfielen 2 %.

In den Langzeittests zum mikrobiellen Abbau der Benzimidazole in Böden war die Mineralisation in beiden untersuchten Bodenarten nach Standard- und Testgülle-Applikation ebenfalls von untergeordneter Bedeutung. Die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände wurde zwar durch die Testgülle-Applikation und im schluffigen Tonboden gefördert, trat aber im Vergleich zu den Sulfonamiden erst in den späteren Inkubationsintervallen auf. Damit wurde die Rückstandsdynamik von der extrahierbaren Fraktion dominiert. In dieser lag Flubendazol als unveränderte Ausgangsverbindung vor, während eine schnellere Konzentrationsabnahme von <sup>14</sup>C-Fenbendazol auf die Bildung von Oxfendazol und Fenbendazolsulfon als korrespondierende Metaboliten zurückzuführen war. Im schluffigen Ton ergaben sich so DT<sub>50</sub>-Werte von 185 Tagen für <sup>14</sup>C-Flubendazol und 9 Tage für <sup>14</sup>C-Fenbendazol. Dieses Abbauverhalten der Benzimidazole spiegelte sich auch in den Kurzzeittests und den Testplot-Experimenten wider.

Sowohl nach Standard- als auch nach Testgülle-Applikation ergab die Bestimmung der Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten für <sup>14</sup>C-Flubendazol und <sup>14</sup>C-Fenbendazol mit 31 bis 141 L kg<sup>-1</sup> eine hohe Sorptionsneigung, so dass daraus keine Verlagerungstendenz in tiefere Bodenschichten abzuleiten ist. Das zeigte sich auch unter Freilandbedingungen. Zwar konnten hier in Serie 1 niedrige Rückstandskonzentrationen bis in 60 cm Bodentiefe gemessen werden. Doch sind diese auf die extremen Versuchsbedingungen zurückzuführen, die durch die 2-stündige Intensivberegnung mit 50 mm h<sup>-1</sup> und die hier deutlich überhöhten Aufwandmengen gekennzeichnet sind. Eine Verlagerung in tiefere Bodenschichten war nicht nachweisbar.

Aus den Ergebnissen der rückstandsanalytisch begleiteten Stabilitätstests für **Ivermectin** in Rindergülle konnte ein DT<sub>50</sub>-Wert von 62 Tagen berechnet werden. Im schluffigen Ton ergaben sich für dieses Makrolid-Antiparasitikum nach Standard- bzw. Test-

gülle-Applikation DT<sub>50</sub>-Werte von 36 bzw. 22 Tagen ähnliche Werte, so dass ein Einfluss der applizierten Testgülle auf das Abbauverhalten von Ivermectin in schluffigem Ton nicht anzunehmen ist. Da allerdings dieser Wirkstoff nicht als <sup>14</sup>C-Radiotracer zur Verfügung stand, ist eine abschließende Beurteilung der erzielten Ergebnisse schwierig, da der Abbauprozess nicht detailliert bilanziert werden konnte. Mit DT<sub>50</sub>-Werten von 7-12 Tagen zeigte sich für Ivermectin auch unter Freilandbedingungen eine den Ergebnissen der Laborexperimente entsprechende Konzentrationsabnahme. Bei K<sub>d</sub>-Werten für Ivermectin nach Standard- und Testgülle-Applikation von > 100 L kg<sup>-1</sup> konnte auch unter Freilandbedingungen keine Verlagerung in tiefere Bodenschichten nachgewiesen werden.

### **Ökotoxizität der Testsubstanzen**

Ein Einfluss der eingesetzten Testsubstanzen auf die Aktivität der bodeninhärenten Mikroorganismen konnte lediglich für Ivermectin bei deutlich überhöhten Ausgangskonzentrationen > 10 mg kg<sup>-1</sup> Boden festgestellt werden. Während in den Kontakttests mit *Arthrobacter globiformis* selbst bei Testkonzentrationen von 100 mg kg<sup>-1</sup> für keines der untersuchten Veterinärpharmaka ein Effekt zu beobachten war, zeigte der Leuchtbakterien-Test mit *Vibrio fischeri* eine pH-Wert-Abhängigkeit der amphoteren Sulfonamide. So war hier mit fallendem pH-Wert eine Abnahme der stimulierenden Wirkung von Sulfadimidin und Sulfadiazin festzustellen, während Sulfamethoxazol eine zunehmende Hemmwirkung verursachte. Die Untersuchungen für Ivermectin ergaben, dass dieses Antiparasitikum für die Leuchtbakterien bioverfügbar, aber nicht toxisch war. Auf aquatische Testspezies übten die Sulfonamide selbst bei deutlich überhöhten Konzentrationen von 100 mg L<sup>-1</sup> keine Effekte aus. In den Untersuchungen der Benzimidazole hingegen waren bei Konzentrationen von 1 mg L<sup>-1</sup> gegenüber 6 der 9 untersuchten Arten Effekte zu beobachten. Für Ivermectin waren in diesem Konzentrationsbereich Wirkungen auf alle Testspezies feststellbar.

### **Testplot-Experimente zum Oberflächenabfluss**

Zur Abschätzung des Runoff-Verhaltens der eingesetzten Veterinärpharmaka wurden 3 Testplot-Serien im Oktober 2002, April 2002 und September 2003 auf Acker- und Grünlandflächen bei Hangneigungen von 7.7 % bis 9.2 % durchgeführt. Nach 2-stündiger Intensivberegnung (50 mm h<sup>-1</sup>) wiesen bereits die erhaltenen Abflussvolumina bei gleicher Hangneigung und gleicher Bodenbearbeitung hohe Variationsbreiten

auf. So konnten auf dem Ackerstandort Volumina zwischen 7 und 130 L ermittelt werden. Auf dem Grünlandstandort lagen die Volumina zwischen 106 und 252 L.

Standortspezifische Unterschiede zeigten sich auch beim Austrag der untersuchten Veterinärpharmaka. So konnten nach 2-stündiger Intensivberegnung von den Testplots der Ackerfläche ein potentieller Austrag der strukturanalogen Sulfonamide **Sulfadiazin**, **Sulfadimidin** und **Sulfamethoxazol** mit der wässrigen Phase von 0.1 bis 2.5 % nachgewiesen werden. In den entsprechenden Untersuchungen auf dem Grünland lagen diese Austräge mit 13 bis 28 % deutlich höher. Partikuläre Austräge waren von untergeordneter Bedeutung. Die zeitaufgelöste Betrachtung der Runoff-Austräge im Berechnungsintervall 0-20 min, das einem Niederschlagsereignis von 17 mm entsprach, ermöglichte die Einschätzung des tatsächlichen Runoff-Risikos, das mit durchschnittlich 0.01 % für Ackerflächen als gering anzusehen ist. Austräge in diesem Zeitfenster von durchschnittlich 4 % stellten dagegen für Grünlandflächen das höhere Runoff-Risiko dar.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse ist ein relevantes Runoff-Risiko der Benzimidazole **Flubendazol** und **Fenbendazol** von Ackerflächen nach Einarbeitung der Gülle nicht gegeben. Nach Abschluss der 2-stündigen Intensivberegnung waren für diese Substanzklasse trotz der hohen Beregnungsintensität durchschnittlich 0.04 % der applizierten Konzentration in der partikulären Phase nachweisbar. Austräge mit der wässrigen Phase der Runoff-Suspensionen waren weniger bedeutend. Auch für **Ivermectin** ist nach Bodenbearbeitung ein Runoff von Ackerflächen als gering einzustufen. Trotz Intensivberegnung wurden in den durchgeführten Testplot-Serien nur durchschnittlich 0.12 % und 0.02 % der applizierten Wirkstoffmenge mit der wässrigen bzw. der partikulären Phase ausgetragen.

### **Weiterer Forschungsbedarf**

Durch das auf Labortests und Testplot-Experimente gestützte experimentelle Versuchsdesign des Runoff-Projektes wird eine Reihe relevanter Aspekte zum Rückstandsverhalten ausgewählter Veterinärpharmaka in güllegedüngten Böden betrachtet. Dieses beginnt mit der **Auswahl der Testsubstanzen**. So stellt insbesondere die Bearbeitung der Sulfonamid-Derivate Sulfamethoxazol und Acetyl-Sulfamethoxazol die Schnittstelle zum ebenfalls vom Umweltbundesamt geförderten Boden-Projekt dar

(Kreuzig, et al., 2005a). Damit wird das Verhalten von Sulfonamiden sowohl als Human- wie auch als Veterinärpharmaka, die über Klärschlamm bzw. Gülle in Böden eingetragen werden können, ausführlich behandelt. Auch im ERAVMIS-Projekt (Boxall et al., 2002, Kay et al., 2004, 2005) sowie in Untersuchungen von Burkhardt et al. (2005) stehen Sulfonamide im Mittelpunkt der Betrachtungen zum Rückstands- und Abflussverhalten, so dass die Sulfonamide mittlerweile die am intensivsten bearbeitete Stoffklasse darstellen. Eine Fortsetzung dieser Arbeiten erfolgt noch durch die DFG-Forschergruppe Tierarzneimittel (Kaupenjohann et al., 2005). Aufbauend auf der bereits u.a. im Runoff-Projekt erarbeiteten Datenbasis sollen im Projekt "Tierarzneimittel in Böden: Grundlagenforschung zur Risikoanalyse" weitere Untersuchungen zur Rückstandsdynamik und Wirkung von u.a. Sulfadiazin in Böden durchgeführt werden. Entsprechendes gilt für Ivermectin, das eine der ausgewählten Testsubstanzen im ERAPharm-Projekt ist, für die Konzepte einer Risikoabschätzung erarbeitet werden sollen (Knacker et al., 2005). Darüber hinaus liefert nur das Runoff-Projekt erste Daten zum Rückstands- und Abflussverhalten der Benzimidazole Flubendazol und Fenbendazol.

In konsequenter Fortführung des Boden-Projektes, in dem bereits Stabilitätstests mit Humanpharmaka in Klärschlamm und Abbau- und Sorptionstests nach Testklärschlamm-Applikation durchgeführt wurden, werden auch im Runoff-Projekt innovative Akzente für das **experimentelle Versuchsdesign** gesetzt. Hier wird die Anwendung von Gülle aus der Intensivtierhaltung als Eintragspfad für Veterinärpharmaka-Rückstände in Böden in Labortests sowie in Testplot-Experimenten verfolgt. Zum einen werden Stabilitätstests entsprechend der Anwendungsmuster der Testsubstanzen in Rinder- oder Schweinegülle durchgeführt. Auf dieser Basis wird zum anderen Testgülle mit kurzfristig gealterten Veterinärpharmaka-Rückständen hergestellt und in den Labortestsystemen eingesetzt. In den Grundzügen wurde damit ein neues Versuchsdesign konzipiert, das im Rahmen der Zulassung von Veterinärpharmaka bisher nicht berücksichtigt wird. Bei dem im Runoff-Projekt erfüllten Arbeitsprogramm mit ca. 500 Laborbatchtests und ca. 2000 Rückstandsanalysen konnte dieses Design allerdings noch nicht zu einem Methodenkatalog mit Richtliniencharakter entwickelt werden. Dieser Schritt wird augenblicklich in dem vom Umweltbundesamt geförderten und im Institut für Ökologische Chemie und Abfallanalytik, Technische Universität Braunschweig, bearbeiteten Forschungsvorhaben "Untersuchungen des Rückstandsverhaltens von Ve-

terinärpharmaka in Gülle und Boden – Ausarbeitung eines Methodenkataloges mit Richtliniencharakter" (kurz: Gülle-Projekt, FKZ 204 67 455) verfolgt. Bezüglich der Ausarbeitung der Stabilitätstests steht die Charakterisierung der eingesetzten Exkrement- und Güllematrix sowie die Herstellung von Testgülle für den Einsatz in Labortests zu Abbau und Sorption in Boden im Mittelpunkt. Auch hierfür wurden mit den Erkenntnissen aus dem Runoff-Projekt die grundlegenden Voraussetzungen geleistet.

Die Testplot-Experimente der **Runoff-Studie** liefern erste Erkenntnisse zum Abflussverhalten der ausgewählten Veterinärpharmaka von güllegedüngten Böden. Aus diesen ergibt sich ein höheres Runoff-Risiko von Grünlandflächen, da sich die zeitnah zur Gülleausbringung durchgeführte Bodenbearbeitung auf der Ackerfläche minimierend auf die Austräge auswirkt. Diese Austragsituation konnte auf der untersuchten Grünlandfläche bisher nur für Sulfonamide betrachtet werden. Aufgrund sich abzeichnender stoff-, standort- und seasonspezifischer Unterschiede lassen sich hieraus allerdings keine zuverlässigen Tendenzen für andere Substanzen mit deutlich unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften ableiten. Zur Ermittlung von Emissionsfaktoren sind deswegen unter Einbeziehung von Veterinärpharmaka aus verschiedenen Stoffklassen weitere Testplot-Experimente erforderlich. Diese sollten jeweils zu praxisüblichen Anwendungszeitpunkten der Gülleausbringung in größerer Anzahl an Versuchsparallelen durchgeführt werden, um die Ergebnisse auch statistisch bewerten zu können. Unter dem Gesichtspunkt des Up-Scalings auf Schlag- bzw. Gebietsmaßstab bieten sich ferner Freilanduntersuchungen unter kontrollierten Versuchsbedingungen an, bei denen rückstandsuntersuchte Gülle aus der Intensivtierhaltung eingesetzt wird, um dann in einer Monitoring-Studie die sich nach Starkregenereignissen ergebenden Eintragungssituationen in Oberflächengewässer zu ermitteln.

## **7. Summary and Conclusions**

Veterinary medicinal products (VMP) applied in livestock husbandry may be excreted as parent compounds and metabolites by production animals via urine and faeces. Hence, residues are released into soil environments by the excretion of dung pats on pasture or by the applications of manures onto arable and grassland. There, VMP undergo degradation and sorption. These concentration determining processes may decide on leaching or surface runoff potentially resulting in ground water and surface water contamination, respectively. Both transport processes have been already identified as environmentally relevant entry routes for pesticides into aquatic ecosystems. Information on VMP, however, lacked at the beginning of the research programme "Investigations on Runoff of Veterinary Medicinal Products from Arable and Grassland after Manure Application" funded by the German Federal Environmental Agency (UBA) from 2002 until 2004 (Runoff Project, FKZ 202 67 435).

The runoff behaviour of VMP after heavy precipitation events may be affected by manure and soil matrix properties. The test-plot studies under field conditions, therefore, were supplemented by laboratory tests on the stability of VMP in manure and on degradability and mobility in soil. This tiered experimental design facilitated an appropriate evaluation of the environmental fate of VMP under study. The Runoff Project thus consequently continued the research project "Environmental Behaviour of Selected Pharmaceutical Medicines and Relevant Metabolites in Soils" also funded by the German Federal Environmental Agency (Soil Project, FKZ 201 67 40/02) and managed in the Institute of Ecological Chemistry and Waste Analysis, Technical University of Braunschweig, from 2001 until 2003. Both projects have definitely extended the current knowledge on fate and behaviour of human and veterinary medicinal products in soil environments.

### **Experimental Design**

The environmental relevance of the manure application on the entry of VMP into soil environments is determined by their substance specific stability during the manure storage. Therefore, the experimental design was first focused on laboratory testing the stability of VMP in manure. On the basis of these stability tests, test slurries with short-term aged VMP residues were prepared and applied in the laboratory-test systems. In contrast to the conventional application of test substances in appropriate organic sol-



vents (**standard application**), the **test-slurry application** facilitated the study of degradability and mobility of VMP in soils under the impact of the manure matrix. This innovative approach contributed to the evaluation of the test-plot experiments under field conditions by simulating the real entry route as closely as possible.

The selected test substances were the sulfonamides **sulfadiazine** and **sulfamethoxazole** and the metabolite **acetyl-sulfamethoxazole** as well as the benzimidazoles **flubendazole** and **fenbendazole**. In the laboratory tests, they were applied as  $^{14}\text{C}$ -labelled radiotracers to set up detailed mass balances considering the mineralisation and the formation of extractable and non-extractable residues. Furthermore, the extracts were screened for parent compounds applied and metabolites formed by means of radio thin layer chromatography. Fate and behaviour of the macrocyclic lactone **ivermectin** was studied, too. Here, residue analytical methods were applied because this test substance was not available as a  $^{14}\text{C}$ -labelled radiotracer. In the test-plot experiments, the patterns of test substances were completed by the sulfonamide **sulfadimidine**.

In laboratory tests, the biodegradability of the test substances was studied in long-term tests (102 days) applying microbially active silty-clay soil and silty-sand soil samples. Additionally, short-term tests (3 days) were conducted in order to distinguish between microbial and chemical degradation and to regard photo-induced effects on these concentration determining processes. Soil/water distribution coefficients ( $K_d$ ,  $K_{OC}$  values) were determined in batch equilibrium tests to assess the mobility of the test substances in soils under study. In order to validate mobility tendencies of  $^{14}\text{C}$ -sulfadiazine, leaching was investigated in laboratory lysimeter tests with undisturbed soil monoliths taking the impact of unsaturated water flow and test-slurry application into special consideration. Further tests were targeted at the chemical and biological characterisation of non-extractable sulfonamide residues in soil with respect to bonding strength and remobilisation under modified experimental conditions. Finally, ecotoxicological effects of VMP on selected test species in terrestrial and aquatic systems were investigated.

In the 3 test-plot series conducted in October 2002 (Series 1), April 2003 (Series 2) and September 2003 (Series 3), the runoff behaviour of the test substances from arable and grassland were studied after manure application and high-intensity sprinkler irrigation. Finally, the fate of VPM in manured soils were monitored in time intervals of 50-663 days.

### **Fate monitoring of the test substances**

In the stability tests in bovine manure, the metabolic fate of <sup>14</sup>C-sulfadiazine, <sup>14</sup>C-sulfamethoxazole and <sup>14</sup>C-acetyl-sulfamethoxazole was predominated by the formation of non-extractable residues. Already 7 days after the standard application, the residues mainly remained non-extractable. During the 102–days incubation periods, the mineralisation did not exceed 2 % of the radioactivity initially applied. Changed metabolic dynamics were found in stability tests exemplarily conducted with <sup>14</sup>C-sulfadiazine in pig manure. There, mass balances were shifted to higher mineralisation rates (18 %) and higher amounts of extractable residues that were predominated by the unchanged <sup>14</sup>C-sulfadiazine.

The predominant formation of non-extractable sulfonamide residues was also reflected by the biodegradability tests in silty-clay and silty-sand soils. Directly after the test-slurry application, on average 80 % of the radioactivity initially applied occurred in the non-extractable fraction. The mineralisation was of subordinate relevance. For sulfonamides, mineralisation of < 5 % and non-extractables residues of > 70 % in 100 days under laboratory conditions were complied with the persistence criteria defined in the pesticide registration procedure. Furthermore, the hydrolysis of <sup>14</sup>C-acetyl-sulfamethoxazole in soil resulting in the formation of <sup>14</sup>C-sulfamethoxazole was confirmed in these batch experiments.

The tests on the chemical characterisation of the non-extractable residues also emphasised the high affinity of sulfonamides to the soil matrix. By means of the sequential extraction technique with methanol/hydrochloric acid and chlorotrimethylsilane, 30 % of the radioactivity retained in the non-extractable fraction after the ethyl acetate treatment were additionally released containing 3 % unchanged <sup>14</sup>C-sulfadiazine. This high matrix affinity was confirmed by the activated sludge test, the *Brassica rapa* test and the *Lumbricus terrestris* test A and B. This biological characterisation focused on remobilisation or immobilisation tendencies of the sulfonamides should be supplemented by long-term laboratory and field studies to improve the environmental risk assessment of non-extractable residues in soil environments.

In the short-term laboratory tests on the microbial and photo-induced microbial as well as on the chemical degradation, non-extractable residues were formed. By the set-up of mass balances, an exclusive impact of soil inherent microorganisms on the formation of non-extractable residues could not be identified. Different dynamics, however, were revealed by the metabolite screening. In the ethyl acetate extracts of microbially

active soil samples, the parent compounds applied were accompanied by non-identified metabolites while the extracts of microbially inactive soil samples were predominated by  $^{14}\text{C}$ -sulfadiazine,  $^{14}\text{C}$ -sulfamethoxazole and  $^{14}\text{C}$ -acetyl-sulfamethoxazole themselves. Photoinduced effects could not be determined neither on the microbial nor on the chemical degradation of sulfonamides in soils.

In the batch equilibrium tests after the standard application, a moderate mobility of the sulfonamides under study were depicted by  $K_d$  values of 1.3 to 2.1 L kg $^{-1}$ . After test-slurry application of  $^{14}\text{C}$ -sulfadiazine and  $^{14}\text{C}$ -sulfamethoxazole, however, the higher sorption was assessed by  $K_d > 10$  L kg $^{-1}$ . In contrast, the mobility of  $^{14}\text{C}$ -acetyl-sulfamethoxazole was not affected by the application technique. These mobility tendencies in soils were also reflected by the laboratory lysimeter tests studying  $^{14}\text{C}$ -sulfadiazine after test-slurry application. Thus, 5 % of the radioactivity initially applied were found in the percolate containing 3 % unchanged  $^{14}\text{C}$ -sulfadiazine. Highest amounts were retained non-extractable in the superficial soil layer.

The results of these laboratory tests were confirmed by the test-plot study under field conditions. In the 3 test-plot series, the concentrations of the sulfonamides **sulfadiazine**, **sulfadimidine** and **sulfamethoxazole** in the 0-15-cm soil layer rapidly dropped below the limit of determination of 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  soil. Leaching into the subsoil layers could not be detected.

Contrary to the sulfonamides, the stability tests in pig manure revealed a slow degradation of benzimidazole under study. After the 102-days incubation period, extractable residues of  $^{14}\text{C}$ -**flubendazole** and  $^{14}\text{C}$ -**fenbendazole** amounted to 72 % and 80 %, respectively. Besides the latter one, its primary metabolite oxfendazole (5 %) was identified. The mineralisation accounted for 2 % of the radioactivity initially applied.

In the long-term degradation tests in soils after standard and test-slurry application, mineralisation was of subordinate relevance, too. Namely by the test-slurry application, the formation of non-extractable residues was enhanced at the later incubation intervals. However, the metabolic dynamic was predominated by the extractable fractions in that  $^{14}\text{C}$ -flubendazole appeared as the parent while  $^{14}\text{C}$ -fenbendazole was accompanied by its corresponding metabolites oxfendazole and fenbendazole sulfone. Thus,  $\text{DT}_{50}$  values were 185 days for  $^{14}\text{C}$ -flubendazole and 9 days for  $^{14}\text{C}$ -fenbendazole. This metabolic fate of the benzimidazoles was also reflected by the short-term laboratory tests and the test-plot study under field conditions.

After standard and test-slurry application, both benzimidazoles were classified as moderately mobile to immobile.  $K_d$  values were 31 L kg<sup>-1</sup> for flubendazole and 141 L kg<sup>-1</sup> for fenbendazole not showing relevant leaching tendencies into deeper soil layers. That was confirmed by the test-plot study. Despite the extreme test conditions, given by the excessive application amounts and the high-intensity sprinkler irrigation, only low concentrations were found in 30-60-cm soil layer in series 1. No residues were found in deeper soil layers.

For the stability of **ivermectin** in bovine manure, a DT<sub>50</sub> value of 62 days was calculated. After the standard and test-slurry application to silty-clay soil samples, DT<sub>50</sub> were 36 and 22 days, respectively, depicting that, contrary to the other test substances, the metabolic fate of ivermectin was not significantly affected by the manure matrix. A definite evaluation of the environmental fate of ivermectin in manure and soils remained limited because this test substance could not be applied as a <sup>14</sup>C-labelled radiotracer in the laboratory-test systems. The concentration determining process, either degradation or sorption, of its rapid disappearance could not be identified. The laboratory results matched those determined in manured soils under field conditions. DT<sub>50</sub> values ranged between 7 and 12 days. Its mobility tendencies depicted by  $K_d$  values > 100 L kg<sup>-1</sup> matched the results of the test-plot study because leaching of ivermectin into deeper soil layers could not be determined.

### **Ecotoxicity of the test substances**

An ecotoxicological effect of the test substances under study on the activity of soil microorganisms was only found for ivermectin at high concentrations of > 10 mg kg<sup>-1</sup> soil. In the contact tests with *Arthrobacter globiformis*, effects by the test substances were not found. By means of the luminescence bacteria test with *Vibrio fischeri*, however, a pH dependent effect of the amphoteric sulfonamides were determined. Parallel to decreasing pH values, stimulating effect of sulfadiazine and sulfadimidine decreased while sulfamethoxazole caused on increasing inhibition. Furthermore, this test showed that the macrolid antiparasite ivermectin was bioavailable, but not toxic against these test species.

Aquatic test species were not effected by sulfonamides despite concentrations of 100 mg L<sup>-1</sup>. Testing benzimidazoles at 1 mg L<sup>-1</sup>, showed effects by 6 of 9 varieties of macro-invertebrates. Effects against ivermectin were observed for every test species studied.

### **Test-plot experiments on runoff**

For the assessment of the runoff behaviour of VMP, 3 test-plot series in October 2002, April 2003 and September 2003 were performed on arable and grassland. Inclination of the test-plots installed ranged from 7.7 to 9.2 %. After the high-intensity sprinkler irrigation at 50 mm h<sup>-1</sup> for 2 h, season and test-plot specific variabilities were reflected by different discharge volumes ranging between 7 and 130 L from arable land and between 106 and 252 L from grassland.

Corresponding to that, different amounts of VMP were released by runoff events. After the high-intensity sprinkler irrigation, potential runoff emissions of the sulfonamides **sulfadiazine**, **sulfadimidine** and **sulfamethoxazole** by the aqueous phase amounted to 0.1 to 2.5 % from arable land. Emissions of particulate matter were of subordinate relevance. From grassland, potential sulfonamide emissions ranged between 13 % and 28 % of the amounts initially applied via test-slurry application. The time-resolved data acquisition during the 0-20-min irrigation intervals, corresponding to a 17-mm precipitation event, facilitated the assessment of actual runoff emissions. Thus, 0.01 % on average were released from arable land while emissions from grassland were on average 4 % reflecting the higher runoff risk.

For the benzimidazoles **flubendazole** and **fenbendazole**, a relevant runoff risk from arable land after manure application, soil cultivation and sprinkler irrigation was not found. After 2-h high-intensity sprinkler irrigation, emissions of particulate matter amounted to 0.04 % on average. Emissions via the aqueous phase of runoff suspensions were of subordinate relevance. After the incorporation of applied manure into arable soil by means of soil cultivator, the runoff emissions of **ivermectin** were on average 0.12 % and 0.02 % via aqueous and particulate phases, respectively.

### **Need of further research activities**

In the frame of the Runoff Project, a tiered experimental design was applied that was based on numerous laboratory tests and test-plot experiments to monitor relevant aspects on the fate and behaviour of selected VMP in manure and manured soils. At first, there was the **selection of test substances** considering structural analogues of different indication classes. Monitoring the fate of the sulfonamide derivatives sulfamethoxazole and acetyl-sulfamethoxale constituted the interface to the Soil Project funded by

the Federal German Environmental Agency, too (Kreuzig et al., 2005a). Thus, the environmental fate of sulfonamides administered as human or veterinary medicinal products and entering soil environments via sewage sludge and manure application, respectively, was thoroughly investigated. Sulfonamides were also considered relevant in the ERAVMIS Project (Boxall et al., 2002, Kay et al., 2004, 2005) and in studies of Burkhardt et al. (2005) focused on their metabolic fate and runoff. Today, sulfonamides belong to the most frequently investigated pharmaceuticals. These research activities have been continued by the Research Group of the German Research Society Veterinary Medicinal Products (Kaupenjohann et al., 2005). Based on the data pool, e.g. partly worked out in the Runoff Project, that project entitled "VMP in Soils: Basic Research for Risk Analysis" has been targeted at further research on the metabolic dynamics and ecotoxicological effects of e.g. sulfadiazine in soils. Furthermore, ivermectin has been selected as one of the test substances of the ERAPharm Project subjected on incentives for the further development of guidance documents (Knacker et al., 2005). Additionally, the Runoff Project dealt with fate monitoring of the benzimidazoles flubendazole and fenbendazole in manure and manured soil.

Already in the Soil Project, stability tests of human medicinal products in sewage sludge were conducted and test-sludge samples were prepared and applied in laboratory-test systems. According to the consequent continuation of those approaches, the Runoff Project has introduced innovative trends in the **experimental design** of laboratory and test-plot studies. Here, the real entry route of VMP into soils via manure application was already considered relevant for laboratory tests and for test-plot experiments. With respect of the administration patterns of VMP, stability tests in bovine and pig manure were conducted. On this basis, test slurries with short-term aged residues were prepared and applied in laboratory-test systems investigating degradation and sorption of VMP in soils. Thus, the principles of an innovative test design have been developed that has not been considered in the frame of the VMP registration procedure, until now. Within the working programme of the Runoff Project, approximately 500 laboratory batch tests and 2000 residue analyses were performed. Therefore, the catalogue of methods could not be completed. This guideline draft is currently in preparation in the frame of current research project "Fate and Behaviour of Veterinary Medicinal Products in Liquid Manure and Manured Soil: Development of Standard Operating Procedures for Laboratory Tests" (briefly: Manure Project, FKZ

204 67 455) also funded by the Federal German Environmental Agency and managed in the Institute of Ecological Chemistry and Waste Analysis, Technical University of Braunschweig. Here, the conception of the stability tests is focused on the characterisation of excrement and manure matrices that are used for the preparation of test slurries and their application in laboratory tests on the degradation and sorption of VMP in manured soils. The scientific basics for this research project have been already performed within the Runoff Project.

The **test-plot study** provided first experimental experiences on the runoff of selected VMP from manured soils after sprinkler irrigation. Here, the higher runoff risk was found from grassland because runoff emissions from arable land were reduced by soil cultivation. These results were only worked out for sulfonamides, until now. According to substance, season and test-plot specific differences, appropriate tendencies cannot be assessed for VMP of different physico-chemical properties. In order to determine substance specific emission factors, therefore, further test-plot studies including VMP of other indication classes are urgently required. Those should be focused on the principles of the good agricultural practice of manure application and conducted in a higher number of replicates to facilitate the statistical data analysis. Taking the up-scaling aspect from the field to the catchment area scale into special account, residue-controlled manure of production animals should be applied in a defined agro-ecosystem to monitor the actual runoff emissions after heavy precipitation events.

## 8. Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge the financial support of the German Federal Environmental Agency and the scientific supervision of Dr. J. Klein-Goedicke. Special thanks deserve Dr. J. Brunotte, Institute for Production Engineering and Building Research, Federal Agricultural Research Centre, Braunschweig, Germany, who supported the runoff study by providing agricultural fields and technical equipment, i.e. sprinkler apparatus, water tanks, tractors, etc. and carrying out the soil cultivation measures in accordance to good agricultural practice. Without his help, the field trials could not have been realised. Thanks to Dr. H. Nordmeyer, Institute for Weed Research, Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany, for providing technical equipment for the soil monolith sampling and thanks to Dr. S. Schrader, Institute of Agro-Ecology, Federal Agricultural Research Centre, Braunschweig, Germany, for supporting the earthworm tests. Furthermore, the supply of  $^{14}\text{C}$ -flubendazole and  $^{14}\text{C}$ -fenbendazole by Dr. L. Van Leemput (Janssen Animal Health, Beerse, Belgium) and Dr. G. Scheef (Intervet Innovation GmbH, Schwabenheim, Germany), respectively, has to be gratefully acknowledged. The possibility of monitoring the fate of both benzimidazoles in manure and manured soil did considerably enhance the data pool of the laboratory experiments and the test-plot study.



## 9. Literaturverzeichnis

- Agnihotri, N.P., Barooah, A.K. (1994): Bound residues of pesticides in soil and plant - A review. *J. Sci. Ind. Res.*, 53, 850-861.
- Anderson, J.P.E., Domsch, H. (1987): A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 10, 215-221.
- Andersson, A., Pålsheden, H. (1991): Comparison of the efficiency of different GLC multi-residue methods on crops containing pesticide residues. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 339, 365-367.
- ASTM (1998): Standard guide for acute toxicity test with the rotifer *Brachionus*, E 1440.
- Aust, M.-O., Thiele-Bruhn, S. (2003): Sorption von Sulfonamid-Antibiotika nach Applikation mit Wirtschaftsdünger auf Boden. *Mitt. d. Deut. Bodenk. Ges.*, 102, 159 – 160.
- Balitz, G. (1999): Determination of benzimidazole residues using liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 727, 167-177.
- Balitz, G., Benesch-Girke, L., Börner, S., Hewitt, S.A. (1994): Comparison of the determination of four sulphonamides and their N<sup>4</sup>-acetyl metabolites in swine muscle tissue using liquid chromatography with ultraviolet and mass spectral detection. *J. Chromatogr. B*, 661, 75-84.
- Bartolucci, G., Pieraccini, G., Villanelli, F., Moneti, G., Triolo, A. (2000): Liquid chromatography tandem mass spectrometric quantitation of sulfamethazine and its metabolites: direct analysis of swine urine by triple quadrupole and by ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 14, 967-973.
- BBA (1986a): Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden - Abbau, Umwandlung und Metabolismus. Richtlinien für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, ACO Druck, Braunschweig.
- BBA (1986b): Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln. Richtlinien für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, ACO Druck, Braunschweig.
- BBA (1990): Auswirkungen auf die Bodenmikroflora. Richtlinien für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 1-1. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, ACO Druck, Braunschweig.
- BBA (1992): Bewertung von Pflanzenschutzmitteln im Zulassungsverfahren. *Mitt. a. d.*

- Biol. Bundesanst., 284, 61-65.
- BBA (1998): Data requirement and criteria for decision-making in the European Union and the Federal Republic of Germany for the authorization procedure of plant protection products. Mitt. a. d. Biol. Bundesanst., 358, 63-68.
- Berns, A. (2003): Struktur- und Bindungsuntersuchungen nichtextrahierbarer <sup>15</sup>N- und <sup>14</sup>C-Simazinrückstände im Boden. Dissertation, RWTH Aachen.
- Boesten, J.J.T.I. (1990): Influence of solid/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil systems. Pestic. Sci., 12, 484-494.
- Börner, S. (1997): Entwicklung einer Multimethode zur Bestimmung von Sulfonamiden in Schweinefleisch mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie, Dissertation, TU Berlin.
- Boxall, A.B.A., Blackwell P., Cavallo R., Kay P., Tolls J. (2002): The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. Toxicol. Lett., 131, 19-28.
- Boxall, A.B.A., Fogg, L., Blackwell, P.A., Kay, P., Pemberton, E. (2001): Review of veterinary medicines in the environment. R&D Technical Report, Environment Agency, UK.
- Brenner, S. (1974): The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71-94.
- Burkhardt, M., Stamm, C., Waul, C., Singer, H., Müller, S. (2005): Surface runoff and transport of sulphonamide antibiotics and tracers on manured grassland. J. Environ. Qual., 34, 1363-1371.
- Capece, B. P. S., Pérez, B., Castellis, E., Arboix, M., Cristòfol, C. (1999): Liquid chromatographic determination of fenbendazole residues in pig tissues after treatment with medicated feed. J. AOAC Int., 82 (5), 1007-1016.
- Chapman, A., Gray, J., Taylor, K., Barrett, K. (2003): Development of a toxicity test methode using the dung beetle *onthophagus taurus*. (Poster), Envirpharma Conference, Lyon, Frankreich.
- Coats, J.R., Metcalf, R.L., Lu, P.-Y., Brown, D.D., Williams, J.F., Hansen, L.G. (1976): Model ecosystem evaluation of the environmental impacts of the veterinary drugs phenothiazine, sulfamethazine, clopidol, and diethylstilbestrol. Environ. Health Persp., 18, 167-179.
- Cuno, M. (1996): Kinetische Untersuchungen zum biologischen Abbau von Mineralölen und PAK. Fortschritt-Berichte VDI, Reihe15 Umwelttechnik Nr. 148, VDI Verlag Düsseldorf.
- Dathe, A., Dieckrüger, B., Stange, F. (1996): Untersuchungen der räumlichen Variabili-

- tät von Bodeneigenschaften unter besonderer Berücksichtigung der Makroporenstruktur. In: Abschlußbericht Sonderforschungsbereich 179 "Wasser- und Stoffdynamik in Agrarökosystemen. Landschaftsökologie und Umweltforschung, 24 (2), 731-782.
- DIN 19733-1 (1998): Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität in Böden. Teil 1: Verfahren mit TTC. Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH, Berlin.
- DIN (2002): Testverfahren mit Wasserorganismen (L 48). 1-15.
- DIN 38412-48 (2002): *Arthrobacter globiformis*-Kontakttest für kontaminierte Feststoffe. Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH, Berlin.
- Ding, J., Drewes, C.D., Hsu, W.H. (2001): Behavioral effects of ivermectin in a freshwater oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem., 20, 1584-1590.
- Dorn, P.B., Vinpond, T.E., Salanitro, J.P., Wisniewski, H.L. (1998): Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, Microtox<sup>®</sup>, and plants. Chemosphere, 37 (5), 845-860.
- Dott, W. , Achazi, R., Eisenträger, A., Hund-Rinke, K., Kördel, W., Neumann-Hensel, H., Peifer, F., Römbke, J., Wiesner, J., Wilke, B-M. (2001): Biologische Testverfahren für Boden und Bodenmaterial. DECHEMA-Arbeitsgruppe „Validierung biologischer Testmethoden für Böden“ - 7. Bericht des interdisziplinären Arbeitskreises „Umweltbiotechnologie –Boden“, Frankfurt am Main.
- Düngeverordnung (1997): Verordnung über die Grundsätze der guten fachlichen Praxis beim Düngen BGBl., I, 1835.
- EMA (1998): Environmental risk assessment for veterinary medicinal products other than GMO-containing and immunological products. EMA/CVMP/055/96-FINAL.
- EN ISO 11348-3 (1998): Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Leuchtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest). Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH, Berlin.
- Farreé, M., Barceló, D. (2003): Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. Trends Anal. Chem., 22 (5), 299-310.
- FEDESA (2001): Antibiotics use in farm animals does not threaten human health. FEDESA/FEFANA press release, 13 July, Brussels.

- Fletouris, D.J., Botsoglou, N.A., Psomas I.E., Mattis, A. (1996): Trace multiresidues analysis of fenbendazole and its sulfoxide, sulfone and p-hydroxylated metabolites in milk by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (12), 3882-3886.
- Fichter, P.M., Holden, P.W. (1992): A field study to meet United States Environmental Protection Agency regulatory for measurement of movement of pesticides to ground water. *Brighton Crop Protect. Conf. Pests. and Diseases*, 7C (15), 853-858.
- Finnern, H., Grottenthaler, W., Kühn, D., Pälchen, W., Schrap, W.-G., Sponagel, H. (1996): *Bodenkundliche Kartieranleitung: mit 91 Tabellen / Ad-hoc-Arbeitsgruppe Bodenkunde der Geologischen Landesämter und der Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe in der Bundesrepublik Deutschland*. 4., verb. und erw. Aufl., Stuttgart. ISBN 3-510-95804-7.
- Fretwurst, S., Ahlf, W. (1996): Modifikation des umu-Testes zum Nachweis genotoxischer und cytotoxischer Wirkungen von feststoffgebundenen Umweltchemikalien. *Vom Wasser*, 86, 353-361.
- Gawlik, B.M., Bo, F., Kettrup, A., Muntau, H. (1999): Characterisation of the second generation of European reference soils for sorption studies in the framework of chemical testing – Part I: chemical composition and pedological properties. *Sci. Total Environ.*, 229, 99-107.
- Gevao, B., Semple, K.T., Jones, K.C. (2000): Bound pesticide residues in soils: a review. *Environ. Pollut.*, 108, 3-14.
- Gevao, B., Mordaunt, C., Semple, K., Pearce, T., Jones, K. (2001): Bioavailability of nonextractable (bound) pesticide residues to earthworms. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 501-507.
- Gruber, V.F., Halley, B.A., Hwang, S.-C., Ku, C.C. (1990): Mobility of avermectin B<sub>1a</sub> in soil. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 886-890.
- Gunkel, J., Rönnpagel, K., Ahlf, W. (1993): Eignung mikrobieller Biotests für gebundene Schadstoffe. *Acta hydrochim. hydrobiol.*, 21 (4), 215-220.
- Guzella, L. (1998): Comparison of test procedures for sediment toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* Bacteria. *Chemosphere*, 37 (14/15), 2892-2909.
- Hahn, T., Berenzen, N., Ehrlich, B., Höltge, S., Jergentz, S., Kreuzig, R., Wogram, J., Schulz, T. (2006): Acute toxicity of five selected veterinary pharmaceuticals to a range of aquatic invertebrates. *Ecotox. Environ. Safety* (in Vorbereitung).
- Haller, M.Y., Müller, S.R., McArde, C.S., Alder, A.C., Suter, M.J.-F. (2002): Quantifica-

- tion of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 952, 111-120.
- Halley B.A., Jacob T.A., Lu A.Y.H. (1989a): The environmental impact of the use of ivermectin: Environmental effects and fate. *Chemosphere* 18, 1543-1563.
- Halley, B.A., Nessel, R.J., Lu, A.Y.H. (1989b): Environmental aspects of ivermectin usage in livestock: general consideration. In: Campbell W. C. (Ed.). *Ivermectin and abamectin*, 162-172, Springer-Verlag, ISBN 0-387-96944-6.
- Hamscher, G., Pawelzick, H.T., Höper, H., Nau, H. (2005): Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24 (4), 861-868.
- Hamscher, G., Sczesny, S., Abu-Qare, A., Höper, H., Nau, H. (2000): Stoffe mit pharmakologischer Wirkung einschließlich hormonell aktiver Substanzen in der Umwelt: Nachweis von Tetracyclinen in güllegedüngten Böden. *Dtsch. tierärztl. Wschr.*, 107 (8), 332-334.
- Hamscher, G., Sczesny, S., Höper, H., Nau, H. (2002): Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with animal slurry by high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 74, 1509-1518.
- Hassel, J.M., Richter, G. (1992): Ein Vergleich deutscher und schweizerischer Regensimulatoren nach Regenstruktur und kinetischer Energie. *Z. Pflanzenern. Bodenk.*, 155, 185-190.
- Heise, J., Höltge, S., Schrader S., Kreuzig, R. (2006): Chemical and biological characterisation of non-extractable residues of sulfonamides in soil. *Chemosphere*, 65, 2352-2357.
- Hollis, J.M. (1991): Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. In: Walker, A. (Ed.), *Monograph No. 47. Pesticides in soils and water: Current perspectives. Proceedings of a symposium organised by the British Crop Production Council. University of Warwick, Coventry, UK.*
- Höllrigl-Rosta, A., Kreuzig, R., Bahadir, M. (1999): Investigations on the metabolic fate of prochloraz in soil under field and laboratory conditions. *Pestic. Sci.*, 55, 531-538.
- Höltge, S. (2005): Zum Rückstandsverhalten von Veterinärpharmaka in güllegedüngten Böden: Labortests und Testplot-Experimente. *Dissertation, TU Braunschweig,*

ISBN 3-933893-40-2.

- House, W.A., Rae, J.E., Kimblin, R.T. (1992): Source-sediment controls on the riverine transport of pesticides. In: B.B.C.P. Council (ed.): Brighton Crop Protection Conference: Pests and diseases 1992, Vol.1, International Conference Brighton England UK, Nov.19-22, 1990. BCPC British Crop Protection Council, Farnham, UK, 865-870.
- Kainz, M., Eicher, A. (1990): Der Weihenstephaner Schwenkdrüsenregner. Manuskript. Lehrstuhl für Bodenkunde der TU München, Freising-Weihenstephan.
- Kaupenjohann, M. (2005): Tierarzneimittel in Böden: Grundlagenforschung zur Risikoanalyse. <http://www.tu-berlin.de/fb7/ioeb/bodenkunde/Forschung/Tierarznei/Allgemein/allgemein.html>.
- Kay, P., Blackwell, P.A., Boxall, A.B.A. (2004): Fate of veterinary antibiotics in a macroporous tile drained clay soil. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23 (5), 1136-1144.
- Kay, P., Blackwell, P.A., Boxall, A.B.A. (2005): Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land. *Chemosphere* (in Druck).
- Klaus, U., Mohamed, S., Volk, M., Spittler, M. (1998): Interactions of aquatic humic substances with anilazine and its derivatives: the nature of the bound residues. *Chemosphere*, 37 (2), 341-361.
- Knacker, T., Duis, K., Ternes, T., Fenner, K., Escher, B., Schmitt, H., Römbke, J., Garric, J., Hutchinson, T., Boxall, A.B.A. (2005): The EU-project ERAPharm. Incentives for the further development of guidance documents? *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 12 (2), 62-65.
- Koinecke, A., Kreuzig, R., Bahadir, M., Siebers, J., Nolting, H.G. (1994): Investigations on the substitution of dichloromethane in pesticide residue analysis of plant materials. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 349, 301-305.
- Kördel, W., Klöppel, H. (1994): Erfassung des Runoff bei der Anwendung von Pflanzenschutzmitteln. Abschlußbericht zum Forschungsvorhaben FKZ 12605087, Umweltbundesamt, Berlin, Deutschland.
- Kolb, M., Meier, C., Kreuzig, R., Bahadir, M. (2006): Laboratory testing on ecotoxicity of veterinary medicinal products in soil. *Ecotox. Environ. Safety* (in Vorbereitung).
- Koschorreck J., Koch C., Rönnefahrt I. (2002): Environmental risk assessment of veterinary medicinal products in the EU: A regulatory perspective. *Toxicol. Lett.*, 131, 117-124.

- Kreuzig, R. (1998): Entwicklung analytischer Methoden zur Differenzierung von Abbau und Sorption als konzentrationsbestimmenden Prozessen für Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffe in Böden. Habilitationsschrift, TU Braunschweig, ISBN 3-89720-291-3.
- Kreuzig, R., Heise, J., Höltge, S. (2006): Das Gülle-Projekt: Ausarbeitung eines Methodenkataloges zur Untersuchung des Rückstandsverhaltens von Tierarzneimitteln in Gülle und güllegedüngten Böden. Mitt. Umweltchem. Ökotox., 12 (2), 39-43.
- Kreuzig R., Höltge S. (2005): Investigations on the fate of sulfadiazine in manured soil: Laboratory experiments and test-plot studies. Environ. Toxicol. Chem., 24 (4), 771-776.
- Kreuzig, R., Höltge, S., Brunotte, J., Berenzen, N., Wogram, J., Schulz, R. (2005b): Test-plot studies on runoff of sulfonamides from manured soils after sprinkler irrigation. Environ. Toxicol. Chem., 24 (4), 777-781.
- Kreuzig, R., Kullmer, C., Matthies, Höltge, S., Dieckmann, H. (2003): Fate and behaviour of pharmaceutical residues in soils. Fresenius Environ. Bull., 12 (6), 550-558.
- Kreuzig, R., Kullmer, Ch., Matthies, B., Plaga, B., Dieckmann, H., Höltge, S. (2005a): Verhalten von in der Umwelt vorkommenden Pharmaka und ihren Metaboliten in Modelltestsyste-men – "Modellsystem Boden". UBA-Texte 11/05, ISSN 0722-186X. Umweltbundesamt, Berlin. <http://www.umweltbundesamt.org/fpdf-l/2897.pdf>.
- Kühne, M, Ihnen, D., Möller, G., Agthe, O. (2000): Stability of tetracycline in water and liquid manure. J. Vet. Med., A 47, 379-384.
- Langhammer, J.-P. (1989): Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe als Rückstände in Gülle und im landwirtschaftlichen Umfeld. Diss., Universität Bonn.
- Langhammer, J.-P., Büning-Pfaue, H., Winkelmann, J., Körner, E. (1988): Chemotherapeutika-Rückstände und -Resistenzverhalten bei der Bestandsbehandlung von Sauen post partum. Tierärztl. Umschau, 6, 375-382.
- Liess, M., Schulz, R., Liess, M. H.-D., Rother, B., Kreuzig, R. (1999): Determination of insecticide contamination in agricultural headwater streams. Wat. Res., 33, 239-247.
- Linke, I., Kratz, W. (2001): Tierarzneimittel in der Umwelt – Erhebung von Tierarzneimittelmengen im Land Brandenburg für den Zeitraum von Juli 1998 bis Juni 1999. Studien und Tagungsberichte, Schriftenreihe des Landesumweltamtes Brandenburg. ISSN 0948-0838.

- Löffler, D. (2003): Fate of human and veterinary pharmaceuticals in water/sediment test systems by analysis via LC-tandem MS and Radio-TLC. Diss., Universität Mainz.
- Loke, M.-L., Jespersen, S., Vreeken, R., Halling-Sørensen, B., Tjørnelund, J. (2003): Determination of oxytetracycline and its degradation products by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in manure-containing anaerobic test systems. *J. Chromatogr., B*, 783, 11-23.
- LUFA (2003): Bodeneigenschaften von Referenzböden. <http://lufa-speyer.de>.
- Madsen, M., Overgaard Nielsen, B., Holter, P., Petersen, O.C., Brochner Jespersen, J., Vagn Jensen, K.-M., Gronvold, J., Nansen, P. (1990): Treating cattle with ivermectin: Effects on the fauna and composition of dung pats. *J. Appl. Ecol.*, 27, 1-15.
- Malkomes, H.-P. (1991): Vergleich der TTC- und INT-Reduktion zum Nachweis von Pflanzenschutzmittelwirkungen auf die Dehydrogenaseaktivität im Boden. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.*, 41, 52-57.
- Martinez-Grueiro, M.M., Martinez-Fernandez, A.R. (1988): Actividad de algunos anti-helminticos convencionales sobre *Caenorhabditis elegans*. *Rev. Iberica. Parasitol.*, 48, 221-226.
- Montforts, M. (2001): Regulatory and methodological aspects concerning the risk assessment for medicinal products; need for research. In: Kümmerer, K. (Ed): *Pharmaceuticals in the Environment*, Springer-Verlag, ISBN3-540-41067-8, 159-174.
- Mougin, C., Kollmann, A., Dubroca, J., Ducrot, P.H., Alvinerie, M., Galtier, P. (2003): Fate of the veterinary medicine ivermectin in soil., *Chem. Lett.*, 1, 131-134.
- Müller, H.G. (1982): Sensitivity of *Daphnia magna* Straus against eight chemotherapeutic agents and two dyes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 28, 1-2.
- Nordmeyer, H., Aderhold, D. (1994): Aufbau und Betrieb einer Lysimeterstation zur Erfassung der Verlagerung von Pflanzenschutzmitteln im Bodenprofil. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, 157, 93-98.
- OECD (1981a): Guideline for testing of chemicals. Inherent biodegradability in soil. 304 A, 1-11.
- OECD (1981b): Guideline for testing of chemicals. Adsorption/Desorption. 106, 1-18.
- OECD (2000a): OECD guideline for testing of chemicals. Adsorption-desorption using a batch equilibrium method. 106, 1-45.
- OECD (2000b): Revised proposal for updating guideline 202 *Daphnia* sp., acute immobilisation test. Revised draft document.



- OECD (2002a): Guideline for the testing of chemicals. Aerobic and anaerobic transformation in soil, 307.
- OECD (2002b): Guideline for testing of chemicals. Proposal for a new guideline. Phototransformation of chemicals on soil surfaces. Draft document, January 2002.
- OECD, (2003). Technical guidance document on risk assessment, Part 2. Environmental risk assessment.
- Oepen von, B., Kördel, W., Klein, W. (1991): Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106. *Chemosphere*, 22 (3-4), 285-304.
- Okafor, F.C. (1990): On the effects of ivermectin on freshwater snails of medical and veterinary importance. *Angew, Parasitol.*, 31, 65-68.
- Oppel, J., Broll, G., Löffler, D., Meller, M., Ternes, T. (2004): Leaching behaviour of pharmaceuticals in soil-testing-systems: A part of an environmental risk assessment for groundwater protection. *Sci. Total Environ.*, 328, 265-273.
- Petersen, M.B., Friis, C. (2000): Pharmacokinetics of fenbendazole following intravenous and oral administration to pigs. *AJVR*, 61 (5), 573-576.
- Pfeifer, T., Tuerk, J., Bester, K., Spiteller, M. (2002): Determination of selected sulfonamide antibiotics and trimethoprim in manure by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 16, 663-669.
- Pietsch, J., Ricordel, D., Imhof, L., Schmidt, W., Werner, P., Croue, J.-P., Brauch, H.-J. (1999): Trace analysis of veterinary chemotherapeutic residues in water by high-performance liquid chromatography. *Vom Wasser*, 92, 51-59.
- Roberts, T.R. (1984): Non-extractable pesticide residues in soils and plants. *Pure Appl. Chem.*, 56 (7), 945-956.
- Rönnpapel, K., Janßen, E., Ahlf, W. (1996): Ökotoxikologische Bewertung von Bodenverunreinigungen mit Hilfe von Biotests. In: Stegmann, R. (Hrsg.), *Hamburger Berichte 10. Neue Techniken der Bodenreinigung*. Economica Verlag, 193-205
- Rönnpapel, K., Janßen, E., Ahlf, W. (1998): Asking for the indicator function of bioassays evaluating soil contamination: Are bioassay results reasonable surrogates of effects on soil microflora?. *Chemosphere*, 36 (6), 1291-1304.
- Rönnpapel, K. (1999): Erfassung und Bewertung von Schadstoffeffekten auf die Mikroflora des Bodens durch biologische Testverfahren. *Fortschritt-Berichte VDI, Reihe 15 Umwelttechnik, Nr. 212*, VDI-Verlag, Düsseldorf.

- Rütters, H., Höllrigl-Rosta, A., Kreuzig, R., Bahadir, M. (1999): Sorption behaviour of prochloraz in different soil. *J. Agric. Food. Chem.*, 47 (3), 1242-1246.
- Scheef, G. (2005): Persönliche Mitteilung.
- Schulz, R., Liess, M. (2001): Acute and chronic effects of particle-associated fenvalerate on stream macroinvertebrates: a runoff simulation study using outdoor microcosms. *Arch. Envir. Contam. Toxicol.*, 40, 481-488.
- Schulz, R., Peall, S.K.C., Dabrowski, J.M., Reinecke, A.J. (2001): Current-use insecticides, phosphates and suspended solids in the Lourens River, Western Cape, during the first rainfall event of the wheat season. *Water South Africa*, 27, 65-70.
- Spaepen, K.R.I., Van Leemput, L.J.J., Wislocki, P.G., Verschueren, Ch. (1997): A uniform procedure to estimate the predicted environmental concentration of the residues of veterinary medicines in soil. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16 (9), 1977-1982.
- Ternes, T., Janex-Habibi, M.-L., Knacker, T., Kreuzinger, N., Siegrist, H. (2004): 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. POSEIDON final report, <http://www.EU-POSEIDON.com>.
- Ternes, T., Römbke, J., Löffler, D., Meller, M., Oppel, J. (2005): Behaviour of selected human and veterinary pharmaceuticals in aquatic compartments and soil. Endbericht. UBA-Texte 05/05 ISSN 0722-186X.
- Thiele-Bruhn, S. (2003): Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 166, 145-167.
- Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986): Zur statistischen Interpretation und graphischen Darstellung des Abbauverhaltens von Pflanzenschutzmittel-Rückständen. II. *Pflanzenschutz-Nachr. Bayer*, 39, 188-204.
- Traunspurger, W., Haitzer, M., Höss, S., Beier, S., Ahlf, W., Steinberg, C. (1997): Ecotoxicological assessment of aquatic sediments with *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) - a method for testing liquid medium and whole-sediment samples. *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 245-250.
- US-EPA (2000): Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates, 2nd edn. EPA 600/R-99/064.
- US-FDA (1995): Environmental assessment: NADA 128-620. Fenbendazole suspension 10 % in dairy cattle of breeding age.
- Vanhala, P.T., Athianinen, J.H. (1994): Soil respiration, ATP content, and *Photobacte-*

- rium* toxicity test as indicator of metal pollution in soil. Environ. Toxicol. Water Chem. 9, 115-121.
- VICH, (2000): VICH Topic GL6: Guideline on environmental impact assessment (EIAs) for veterinary medicinal products – Phase I.
- VICH (2003): Environmental impact assessment (EIAs) for veterinary medicinal products (VMPs) – Phase II Draft Guidance, GL 38 (Ecotoxicity Phase II), Draft 1.
- Wang, W., Kreuzig, R., Bahadir, M. (1998): Laboratory lysimeter experiments on leaching of triallate and its metabolite 2,3,3-trichloro-prop-2-en-sulfonic acid in soil. Fresenius Environ. Bull., 7, 627-634.
- White, J.C., Mattina, M.I., Lee, W., Eitzer, B.D., Iannucci-Berger, W. (2003): Role of organic acids in enhancing and uptake of weathered p,p'-DDE by *Curcubita pepo*. Environ. Pollt., 124, 71-80.
- Winckler, C., Engels, H., Hund-Rinke, K., Luckow, T., Simon, M., Steffens, G. (2004): Verhalten von Tetracyclinen und anderen Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden (Wirkung von Tetracyclin und anderen Tierarzneimitteln auf die Bodenfunktion). UBA-Texte 44/04. ISSN 0722-186X.  
URL: <http://www.umweltbundesamt.de>.
- Winckler, C., Grafe, A. (2000): Charakterisierung und Verwertung von Abfällen aus der Massentierhaltung unter Berücksichtigung verschiedener Böden. UBA-Texte 44/00, ISSN 0722-186X. Umweltbundesamt, Berlin.
- Wogram, J., Liess, M. (2001): Rank-ordering of macroinvertebrate species sensitivity to toxic compounds by comparison with that of *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 67: 360-367.
- Wollenberger, L., Halling-Sørensen, B., Kusk, K.O. (2000): Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. Chemosphere, 4, 723-730.