

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

– Runoff-Projekt¹ –

Robert Kreuzig, Sibylla Höltge, Julia Heise, Marit Kolb

Institut für Ökologische Chemie und Abfallanalytik, TU Braunschweig

Norbert Berenzen, Torsten Hahn, Stefan Jergentz, Jörn Wogram, Ralf Schulz

Zoologisches Institut, TU Braunschweig

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

¹ UBA-FKZ 202 67 435; 2002-2004

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 Veterinärpharmaka-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}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}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. Schließlich 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 ¹⁴C-Sulfadiazin, ¹⁴C-Sulfamethoxazol und ¹⁴C-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 ¹⁴C-Sulfadiazin in Schweinegülle ergab sich hingegen eine Verschiebung der Bilanzen zugunsten der ¹⁴C-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 ¹⁴C-Acetyl-Sulfamethoxazol in diesen Batchexperimenten die hydrolytische Umwandlung in ¹⁴C-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 ¹⁴C-Sulfadiazin als unveränderte Ausgangsverbindung. Insgesamt zeigte sich hier eine hohe Affinität der ¹⁴C-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}C -Sulfadiazin, ^{14}C -Sulfamethoxazol bzw. ^{14}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}C -Sulfadiazin, ^{14}C -Sulfamethoxazol und ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol nach Standard-Applikation mit 1.3 bis 2.1 L kg⁻¹ eine mäßige Mobilität aus. Während nach Testgülle-Applikation für ^{14}C -Sulfadiazin- und ^{14}C -Sulfamethoxazol-Rückstände mit K_d -Werten > 10 L kg⁻¹ eine stärkere Sorption zu verzeichnen war, ergab sich für ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol-Rückstände mit 2 L kg⁻¹ ein der Standard-Applikation entsprechender Wert. In den für ^{14}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}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 µg kg⁻¹ zu beobachten. 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 betrug diese Anteile für **^{14}C -Flubendazol** und **^{14}C -Fenbendazol** 72 bzw. 80 %. Letzteres wurde dabei in den Extrakten von seinem primären Metaboliten Oxfen-dazol (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 eben-

falls 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 ^{14}C -Fenbendazol auf die Bildung von Oxfendazol und Fenbendazolsulfon als korrespondierende Metaboliten zurückzuführen war. Im schluffigen Ton ergaben sich so DT_{50} -Werte von 185 Tagen für ^{14}C -Flubendazol und 9 Tage für ^{14}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 ^{14}C -Flubendazol und ^{14}C -Fenbendazol mit 31 bis 141 L kg^{-1} 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^{-1} 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_{50} -Wert von 62 Tagen berechnet werden. Im schluffigen Ton ergaben sich für dieses Makrolid-Antiparasitikum nach Standard- bzw. Testgülle-Applikation DT_{50} -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 ^{14}C -Radiotracer zur Verfügung stand, ist eine abschließende Beurteilung der erzielten Ergebnisse schwierig, da der Abbauprozess nicht detailliert bilanziert werden konnte. Mit DT_{50} -Werten von 7-12 Tagen zeigte sich für Ivermectin auch unter Freilandbedingungen eine den Ergebnissen der Laborexperimente entsprechende Konzentrationsabnahme. Bei K_d -Werten für Ivermectin nach Standard- und Testgülle-Applikation von $> 100 \text{ L kg}^{-1}$ 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 $> 10 \text{ mg kg}^{-1}$ Boden festgestellt werden. Während in den Kontakttests mit *Arthrobacter globi-*

formis selbst bei Testkonzentrationen von 100 mg kg^{-1} 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^{-1} keine Effekte aus. In den Untersuchungen der Benzimidazole hingegen waren bei Konzentrationen von 1 mg L^{-1} 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^{-1}) 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 Beregnungsintervall 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 ERAVPharm-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 Eintragungspfad 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 Veterinärpharmakarückständen 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 Veterinärpharmaka 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 Versuchsp parallelen 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.

Investigations on Runoff of Veterinary Medicinal Products from Arable and Grassland after Manure Application

– Runoff Project¹ –

Robert Kreuzig, Sibylla Höltge, Julia Heise, Marit Kolb

Institute of Ecological Chemistry and Waste Analysis, TU Braunschweig

Norbert Berenzen, Torsten Hahn, Stefan Jergentz, Jörn Wogram, Ralf Schulz

Zoological Institute, TU Braunschweig

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.

¹ UBA-FKZ 202 67 435; 2002-2004

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 solvents (**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}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}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}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 ¹⁴C-sulfadiazine, ¹⁴C-sulfamethoxazole and ¹⁴C-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 ¹⁴C-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 ¹⁴C-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 ¹⁴C-acetyl-sulfamethoxazole in soil resulting in the formation of ¹⁴C-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 ¹⁴C-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 ¹⁴C-sulfadiazine, ¹⁴C-sulfamethoxazole and ¹⁴C-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 ¹⁴C-sulfadiazine and ¹⁴C-sulfamethoxazole, however, the higher sorption was assessed by $K_d > 10$ L kg⁻¹. In contrast, the mobility of ¹⁴C-acetyl-sulfamethoxazole was not affected by the application technique. These mobility tendencies in soils were also reflected by the laboratory lysimeter tests studying ¹⁴C-sulfadiazine after test-slurry application. Thus, 5 % of the radioactivity initially applied were found in the percolate containing 3 % unchanged ¹⁴C-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 µg 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 ¹⁴C-flubendazole and ¹⁴C-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 ¹⁴C-flubendazole appeared as the parent while ¹⁴C-fenbendazole was accompanied by its corresponding metabolites oxfendazole and fenbendazole sulfone. Thus, DT₅₀ values were 185 days for ¹⁴C-flubendazole and 9 days for ¹⁴C-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⁻¹ for flubendazole and 141 L kg⁻¹ 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_{50} value of 62 days was calculated. After the standard and test-slurry application to silty-clay soil samples, DT_{50} 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 ^{14}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_{50} values ranged between 7 and 12 days. Its mobility tendencies depicted by K_d values $> 100 \text{ L kg}^{-1}$ 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 $> 10 \text{ mg kg}^{-1}$ 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^{-1} . Testing benzimidazoles at 1 mg L^{-1} , showed effects by 6 of 9 varieties of macroinvertebrates. 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^{-1} 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.