

Charakterisierung der akut toxischen Wirksamkeit auf Organismen und standardisierte Enzymsysteme

Die wirkungsbezogene Analytik, ein geeignetes Verfahren für eine Risikoanalytik und Risikobewertung im Umweltmanagement

Christel Weins und Rainer Kirn, Landesamt für Umweltschutz des Saarlandes,

Don Bosco Str.1, 66119 Saarbrücken

1.1 Allgemeine Anmerkungen

Beim vorsorgenden Umweltschutz im Sinne des „sustainable development“ (Agenda 21) steht der schonende Umgang mit Naturgütern und der Schutz dieser Naturgüter im Zentrum der Anstrengungen. Vorbeugender aktiver Umwelt- und Verbraucherschutz bedeutet Risikomanagement mit dem Ziel, den Schutz der Menschen vor Risiken zu gewährleisten bzw. die Risiken zu erkennen und zu begrenzen. Grundlage für die Abschätzung der Umweltrisiken sind zuverlässige Daten über die Umweltwirkungen von Schadstoffen. Bei der Risikoabschätzung sind Kenntnisse erforderlich einerseits über die Wirkung der Einzelschadstoffe in den Umweltmedien, andererseits über die Summeneffekte in den Ökosystemen sowie das Abbauverhalten und die Wirkungen der Metabolite.

Wichtigstes Anliegen der Risikoanalytik ist es, Schadwirkungen zu identifizieren, anschließend zu quantifizieren (**Risikoidentifikation**) und toxischen Substanzen bzw. Substanzgruppen zuzuordnen. Bei der Risikoidentifikation sollten alle Risiken erfasst und schnell zu präzisen und verwertbaren Ergebnissen führen.

Risikoanalytik erfordert die Bewertung der Ergebnisse methodenübergreifend, d.h. mit chemisch-physikalischen, biologischen, biochemischen und molekularbiologischen Verfahren.

Innerhalb der Risikoanalytik müssen sowohl Schadwirkungen quantifiziert als auch Schwellenwerte und ein tragbares Risiko ermittelt werden.

1.1.1 Probleme des derzeitigen Analytikkonzeptes

Der Einsatz biologischer Toxizitätsteste sowie enzymatischer Hemmteste als Screeningverfahren in der Grund-, Trink-, Oberflächen- und Abwasseranalytik bringt den ersten Hinweis für das Vorhandensein toxischer Schadstoffe in einer Umwelt. Die Ergebnisse dieses "Biomonitorings" zeigen in der Regel die Summeneffekte von Schadwirkungen in einem definierten Testsystem auf, wobei eine Einzelstoffidentifizierung nicht möglich ist.

Der Beweis für die Anwesenheit einer oder mehrere Schadstoffe, die für den toxischen Effekt im oben eingesetzten Testsystem verantwortlich sind, muss anschließend durch die instrumentelle Analytik - vorzugsweise eingesetzt für die Einzelstoffanalytik wie die Gaschromatographie oder Flüssigkeitschromatographie (HPLC, HPTLC) - erbracht werden, die mittlerweile Einzelstoffe in geringsten Spuren (im ng- bzw. pg- Bereich) identifizieren kann.

Die instrumentelle Analytik bedarf ihrerseits einer selektiven Anreicherung des Wirkstoffes aus der entsprechenden Matrix:

Nach einer analytischen Feintrennung erfolgt die Identifizierung mit Hilfe ausgewählter Referenzsubstanzen an die sich die Quantifizierung des Wirkstoffes anschließt. Hier ergeben sich die Schwierigkeiten bei der Verwendung relevanter Referenzsubstanzen. Nur die Substanzen, nach denen der Analytiker sucht, können gefunden werden. Eine Erfassung unbekannter Substanzen oder Metabolite in der Umweltprobe mit einer biologisch/toxikologischen Schadwirkung erfolgt in der Einzelstoffanalytik nicht. Bei einer Schadstoffpalette von über 30000 relevanten Chemikalien und deren Abbauprodukten ist die chemische Einzelstoffanalytik überfordert.

Die Geschichte der Umweltanalytik zeigt, dass die Einzelstoffanalytik prioritärer Schadstoffe das Risikopotential nur unzureichend abbildet und daher kein geeignetes Instrument des Risikomanagements im Sinne eines vorsorgenden Umweltschutzes darstellt.

1.2 Ziel der Arbeit

Hauptziel dieses Teilprojektes ist die Fraktionierung der organischen Bestandteile (DOC) einer Wasserprobe in ihre polaren und unpolaren Bestandteile und dem Einsatz der wirkungsbezogenen Analytik.

Hierbei wurden zum einen unterschiedliche Oberflächengewässer und anthropogen belastete Wässer von kommunalen und industriellen Kläranlagen charakterisiert. Zum anderen wurden nach dem Auftreten toxisch relevanter Parameter in den polaren oder unpolaren Anteilen der organischen Bestandteile der Wasserprobe die Ursachen für diese toxische Effekte aufgespürt und nachgewiesen.

1.3 Grundlagen der wirkungsbezogenen Analytik mit der HPTLC

Die wirkungsbezogene Analytik setzt sich aus einer Kopplung zweier unterschiedlicher Verfahren zusammen. Zum einen wird für die Schadstoffanalytik ein analytisches Verfahren in der Spurenanalytik für die Bestimmung ausgewählter organischer Schadstoffe eingesetzt, zum anderen schließt sich nach der physikalisch/chemischen Auswertung ein biologischer bzw. ein biochemischer Toxizitätstest an und ermöglicht somit nach der chemisch/physikalischen Charakterisierung der Probe eine direkte wirkungsbezogene Beurteilung.

1.3.1 Chemisch-physikalisches Verfahren der instrumentellen Analytik

Der 1. Schritt besteht aus einer Bestimmung organischer Schadstoffe mittels **Automated-Multiple-Development (AMD)**-Technik im Spurenbereich in der **High-Performance Thin-Layer Chromatographie (HPTLC)**.

Die Auftrennung der Substanzen in der Chromatographie erfolgt mit einem **Universalgradienten** aufgrund ihrer Polarität. Die Identifikation und Bestimmung wird durch in-situ-Remissionsmessung bei 7 Wellenlängen (200-320 nm) durchgeführt.

Die Identifikation einzelner Stoffe erfolgt zunächst - wie in der HPLC- aufgrund der Lage im Chromatogramm und mit Hilfe einer Spektrenbibliothek anhand des Remissionsspektrums.(BURGER 1988)

Die Nachweisgrenze ist hierbei in der Regel abhängig vom Adsorptionskoeffizienten des entsprechenden Stoffes oder Derivates.

1.3.2 Toxizitätstest (in situ)

Im 2. Schritt werden auf dem gleichen Chromatogramm mittels einer Kopplung mit einem biologischen/biochemischen Toxizitätstest die Wirkstoffe detektiert, die den entsprechenden Organismus im Testsystem schädigen.

Hierbei können Testorganismen, wie Pilzsporen , Hefezellen oder Bakterien (HOSTETTMANN 1997, HAMBURGER 1987) bzw. auch Zellorganellen, wie Chloroplasten [HERMANNNS 1995) in einem entsprechenden Nährmedium auf das Chromatogramm gebracht werden. Das biologische Signal wie Hemmung oder Stimulation des Wachstums, Hemmung oder Stimulation der Lumineszenz [WEINS und JORK 1996) oder Hemmung der Photosynthese dient zum einen der Zuordnung von toxischen Substanzen im Chromatogramm oder weist zu anderen auf unbekannte toxikologisch relevante Stoffe erst hin. Neben den Einsatz von organismischen oder suborganismischen Testverfahren können postchromatographisch auf der Dünnschichtplatte auch Enzym-

hemmteste (MENDOZA und SHIELDS 1973) als biochemischer Marker für toxikologisch relevante Stoffe durchgeführt werden.

Die Dokumentation kann per Flachbettscanner oder per Videokamera erfolgen und die Hemmung in definierten Toxizitätseinheiten mit Hilfe der Bildanalyse quantitativ angegeben werden.

Die Nachweisgrenze ist hierbei abhängig von der Toxizität des entsprechenden Stoffes in diesem definierten Testsystem.

1.4 Auswahl der Proben

Innerhalb des WISBOB Projekt wurden Proben aus folgenden Bereichen untersucht:

1.4.1 Abwasser

Ablauf der Kläranlage Neurod vom 1.6.1999

Zulauf der Kläranlage Neurod vom 1.6.1999

Industrieabwasser (Kokereiabwasser)

1.4.2 Oberflächengewässer

Holosee vom 14.6.1999

Bostalsee vom 16.6.1999

5 Probestellen der Alb 1- Alb 5 (Juli 1999 – Februar 2000)

Alb 1 (Alb unmittelbar vor der Kläranlage Neurod),

Alb 2 (Ablauf der Kläranlage Neurod),

Alb 3 (Alb ca. 4 km nach der Kläranlage Neurod),

Alb 4 (Alb unmittelbar vor der Kläranlage Neureut),

Alb 5 (Ablauf der Kläranlage Neureut),

Alb 6 (Alb ca. 5 km nah der Kläranlage Neureut)

10 Probestellen aus Luxemburg, Frankreich, Rheinland Pfalz und dem Saarland
(Mai 2000 bis September 2000)

Luxemburg:	die Sauer bei Wasserbillig;
	die Alzette bei Ettelbruck;
	die Wiltz bei Tutschemillen
Frankreich:	die Mosel bei Millery;
	die Saar bei Keskastel,
	die Mosel bei Chatel Nomexy,
	La Meurthe bei Azerailles
Rheinland Pfalz:	die Saar bei Kanzem;
	die Mosel bei Frankel, bei Palzem und bei Koblenz
Saarland:	die Saar bei GÜdingen und bei Fremersdorf
	die Nied bei Niedaltdorf

1.4.3 Fraktionen der Alb1 und Alb5 der AG Frimmel

In der Arbeitsgruppe von Prof. Frimmel wurden die Wasserproben Alb 1 und Alb 5 wie folgt fraktioniert, gefriergetrocknet und an die verschiedenen Arbeitsgruppen verschickt: Für die UF-Fraktionierung wurden drei 200 ml-Rührzellen von Amicon/Millipore (Modell 8200, Millipore, USA) eingesetzt. Als Membranen für die Fraktionierung wurden regenerierte Cellulosenitratmembranen von Amicon/Millipore verwendet (Anreicherung: YM1; nominal molecular weight cutoff (nMWCO) = 1 kDa, Fraktionierung: YM30, nMWCO = 30 kDa, YM10 und YM3). Die Membranen wurden vor Gebrauch für mindestens 2 h in demineralisiertem Wasser eingelegt und anschließend in den Rührzellen mit demineralisiertem Wasser bei einem Druck von 3 bar (N₂-Gas, 99.999 %) gespült, um die Glycerinschutzschicht zu entfernen. Das Konzentrat der Originalprobe (Konzentrat der YM1-

Membran) wurde, nacheinander durch die einzelnen Membranen (von hohem zu niedrigem nMWCO) filtriert, wobei die Konzentrate jeweils als Fraktionen gesammelt wurden. Die Permeate von YM1 und YM3 entsprechen den Fraktionen F5 (< 1 kDa) und F4 (1 – 3 kDa).

1.5 Experimentelle Bedingungen

Chemikalien. Lösemittel für die HPTLC-AMD wurden in Lichrosolv-Qualität (Merck, Darmstadt, BRD) verwendet, alle weiteren Chemikalien wurden in p.A. Qualität eingesetzt, HPTLC-Kieselgel 60 Platten F₂₅₄ 10 x 20 cm, Schichtdicke 200 µm (Merck 5642, Darmstadt, BRD), Cholinesterase aus Rinderserum, Rinderserumalbumin, Echtblau B, Naphthylacetat, (Merck, 5642 Darmstadt, BRD).

Geräte: AMD2 (CAMAG, Muttenz, Schweiz), Linomat IV (CAMAG, Muttenz, Schweiz), TLC Scanner 3 (CAMAG, Muttenz, Schweiz), Tauch-Gerät (BARON, Insel Reichenau, BRD), Peltier Cooled CCD Kamera SensiCam[®] (AVT Horn, Aalen, BRD), CabUVIS (DE-SAGA, Heidelberg, BRD) feuchte Kammer aus Glas(20 x 20 cm),

Reinigung der HPTLC-Platten. Für quantitative Untersuchungen wurden vor der Applikation der Proben die HPTLC-Platten vollständig für mindestens 8 h in 2-Propanol eingetaucht und anschließend 30 min bei 110° C aktiviert.

1.5.1 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgt gemäß DIN 38 407 Teil 11. Die organischen Inhaltsstoffe von 100 ml nativer kommunaler Abwasserprobe bzw. 500 mL Oberflächenwasser wurden an einer mit Methanol konditionierten RP18 Kartusche angereichert, mit Methanol extrahiert, unter N₂ eingedampft und in 200 µl Methanol wieder aufgenommen.

Fraktionierung eines Abwassers

Aus 40 mL Kokereiabwasser, bei dem im Leuchtbakterienhemmtest eine positive Hemmung gemessen wurde (Gf 4), wurde mit verschiedenen Extraktionsverfahren versucht, die organischen Inhaltsstoffe des Kokereiabwassers in polare und unpolare Stoffe zu fraktionieren, mit dem Ziel, die für diese Hemmung verantwortlichen Inhibitoren zu identifizieren. (siehe Abb. 1)

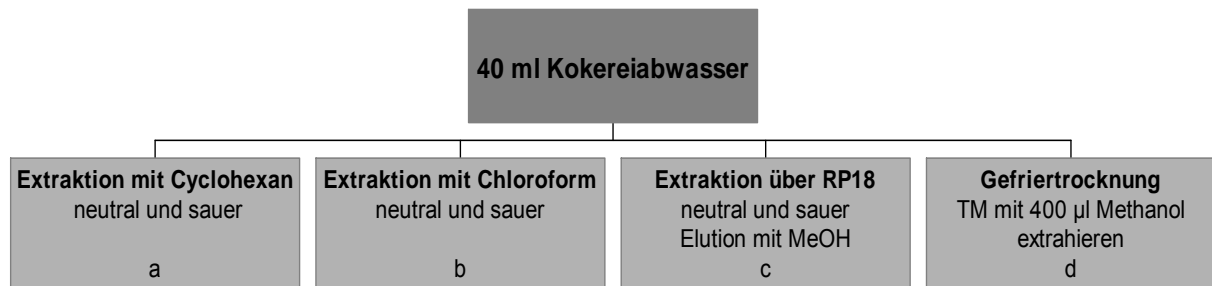


Abb. 1: Fraktionierung eines Kokereiabwassers in polare und unpolare Stoffgruppen
(TM = Trockenmasse)

Probenvorbereitung der gefriergetrockneten Fraktionen.

Die Wirkstoffe aus der Trockenmasse (TM) der einzelnen gefriergetrockneten Fraktionen wurden mit Methanol im Ultraschallbad extrahiert. Der Extrakt unter N₂ eingedampft und

in 1 ml (Originalprobe und Permeat) bzw. in 0,5 ml Methanol (Ultrafiltrat Fraktion 1 bis Fraktion 5) gelöst. (s. Abb.2)

Für die Chromatographie wurden jeweils 20 µL bis 50 µl Extrakt auf die HPTLC Platte appliziert.

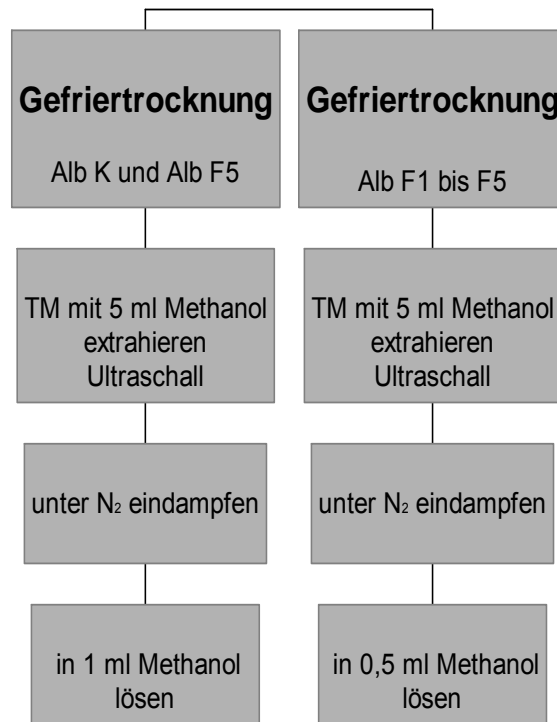


Abb. 2: Extraktion bioaktiver Stoffe aus der Trockenmasse der einzelnen Fraktionen

1.5.2 Chromatographische Auftrennung und Fingerprint der Wasserprobe

Die Auftrennung der Substanzen in der Normalphasen-Dünnschichtchromatographie erfolgt mit einem **Universalgradienten** aufgrund ihrer Polarität mittels **Automated-Multiple-Development (AMD)**-Technik gemäß DIN 38 407 Teil 11. Der Gradient ist ein 33 Stufengradient basierend auf Dichlormethan, der mit Acetonitril als polare Komponente beginnt und mit n-Hexan als unpolare Komponente endet.

Eine mögliche Identifikation und Bestimmung von Einzelstoffen kann somit durch eine in-situ-Remissionsmessung bei 7 Wellenlängen (200 nm -320 nm) durchgeführt werden.

Die Identifizierung einzelner Stoffe erfolgt einerseits aufgrund der Lage im Chromatogramm und andererseits mit Hilfe einer Spektrenbibliothek anhand des Remissionspektrum.

1.5.3 Postchromatographischer Nachweis von bioaktiven Schadstoffen

Das Chromatogramm wird vom Fließmittel befreit und nach der physikalischen Auswertung können bioaktive Schadstoffe mit Hilfe organismischer und suborganismischer Testverfahren postchromatographisch auf dem Chromatogramm detektiert werden. Das jeweilige Chromatogramm wird 3 sec in die organismische Suspensionslösung bzw. Enzymlösung getaucht und die überschüssige Lösung wird am Boden der Platte mit Haushaltspapier abgezogen.

Bei der Detektion von Inhibitoren der Biolumineszenz wird die Biolumineszenz des *Photobacterium vibrio fisherii* mit einer gekühlten CCD-Kamera bei einer Belichtungszeit von 600 – 800 sec. direkt auf dem Chromatogramm dokumentiert.

Bei der Bestimmung von fungiziden bzw. bakteriziden Stoffen werden die HPTLC-Platten in einer feuchten Kammer (am Kammerboden mit wassergetränktem Haushaltspapier ausgelegt) 16h bei 25 °C inkubiert .

Auf Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator, der bei 254 nm angeregt wird, können die durch Fungizide bzw. Antibiotika hervorgerufenen Hemmhöfe bereits nach 16 h Inkubation bei einer Bestrahlung der Platte mit 254 nm mit Hilfe der Videodokumentation aufgezeichnet werden. Die Vitalität der Bakterien kann ebenso durch Besprühen des bewachsenen Chromatogramms mit einer Lösung eines Tetrazoliumsalzes (MTT-Lösung 3

mg/ml) dargestellt werden. Anschließend kann die Platte in der Laborluft getrocknet und mit einem Flachbett-Scanner dokumentiert werden.

Photobacterium fischeri, Stamm NRRL B-11177 gefriergetrocknet, wurde gemäß DIN 38 412 Teil 32 rekonstituiert. Die Zellen wurden in einem Vollmedium nach einem Verfahren, dass in DIN 38 412 Teil 34 beschrieben wird, kultiviert, 20 h auf einem Schüttelgerät (150 rev per min) bei 21 °C .

Bacillus subtilis, ATCC 6633, wurde von der Fa. Merck als Sporensuspension bezogen und in einer entsprechenden Tauchlösung 2h bei 30 °C für die Dünnschichtchromatographie inkubiert(Chrom Biodip® Antibiotics Merck Darmstadt, FRG).

Penicillium Stämme und Hefestämme (z.B *Penicillium expansum* ATCC 7861) wurden auf Sabouraud Agar kultiviert. Die Sporen von *penicillium spezies* wurden für den Test in einer Glucose-Mineral Salz Lösung suspendiert (HOSTETTMANN 1997], während die Hefestämme in einem Sabouraud flüssig-Medium (3-4 Stunden Wachstum vor dem Test) mit 0,035 % Gelrite® inkubiert wurden.

Cholinesterase-Hemmtest: Die Detektion der Cholinesterase-Inhibitoren erfolgt mithilfe des Cholinesterase-Hemmtestes. Die Hemmwirkung wird durch die verminderte enzymatische Hydrolyse von 1-Naphthylacetat zu 1-Naphthol und Essigsäure und anschließender Kupplung des 1-Naphthols zu einem violettblauen Farbstoff (Diazoniumsalz Echtblau B) nachgewiesen Es entstehen auf den toxikologisch wirksamen Substanzen weiße Hemmzonen auf farbigem Untergrund (WEINS und JORK 1996).

1.6 Nachweis antibiotischer Wirkung in Gewässerproben

In den letzten zehn Jahren konnte ein deutlicher Anstieg der Anzahl antibiotikaresistenter Bakterien beobachtet werden, die bis zu acht Antibiotika gleichzeitig resistent sind. Antibiotikaresistente Bakterien treten vor allem in Bereichen vermehrt auf, in denen Antibioti-

ka zum Einsatz kommen. Es konnte gezeigt werden, dass antibiotikaresistente Bakterien in großen Mengen in die Umwelt eingetragen werden. Zum einen werden sie aus der Intensivtierhaltung über die Gülle und Mistausbringung direkt in die Umwelt freigesetzt, zum anderen aus klinischen und häuslichen Abwässern in den Kläranlagen gesammelt und von dort über das geklärte Abwasser in die Umwelt entlassen. Es werden jedoch nicht nur antibiotikaresistente Bakterien freigesetzt, sondern auch Antibiotika selbst. Somit muss eine Frage diskutiert werden, inwieweit Antibiotika nicht nur beim Einsatz in den Kliniken oder Tierhaltung an der Selektion antibiotikaresistenter Bakterien beteiligt sind, oder ob sie nach dem Eintrag in die Umwelt auch dort noch insbesondere in den Kläranlagen eine Zunahme antibiotikaresistenter Bakterien bewirken (FEUERPFIL et al. 1999).

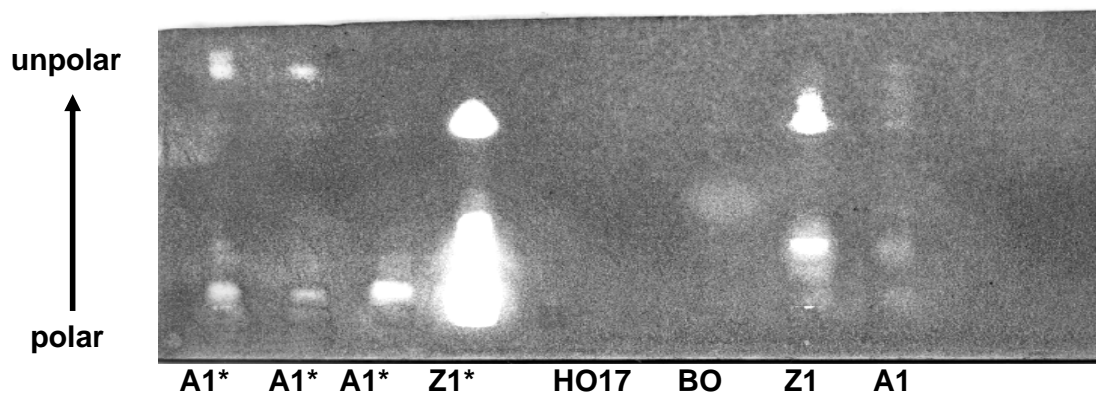


Abb. 3: bakterientoxische Wirkstoffe im Zu- bzw. Ablauf einer Kläranlage

Z1 = Zulauf; A1 = Ablauf; HO17 = Hohlosee, BO = Bostalsee

(* Methanolische Extrakte der Trockenmasse aus 40 mL nativer Abwasserprobe)

Hiermit kommt der Messung von antibiotisch wirksamen Substanzen in Gewässern eine steigende Bedeutung zu.

Nach der Chromatographie mit der AMD-Technik dient *Bacillus subtilis* (BGA) als Testorganismus für den postchromatographischen Antibiotika-Test. Durch antibiotisch wirksa-

me Hemmstoffe wird das Wachstum der Testkeime auf dem Dünnschichtchromatogramm gehemmt und durch Hemmhöfe angezeigt. Die Detektion erfolgt mit einem Bakterienvitalitätstest, durch Besprühen des Bakterienrasens auf dem Dünnschichtchromatogramm mit einem MTT-Tetrazoliumsalzes. Die Größe des Hemmhofs wird bestimmt einerseits durch die applizierte Menge und andererseits durch die Wirkungsspezifität der Substanz.

Die Abläufe der Kläranlagen weisen deutlich eine Reduzierung der antibiotischen Wirksamkeit aus, doch ist bei zwei Proben eine mögliche Neusynthese von antibiotisch wirksamer Substanzen mit einer unpolaren Struktur deutlich zu beobachten (s. Abb. 3).

Dokumentation bakterientoxischer Wirkstoffe im Flussprofil der Alb (1-6) vom 13.10.99

Bei nachfolgenden Probestellen wurden im Juli 99 und Oktober 99 je 1 L Wasserprobe gezogen und gekühlt zu den einzelnen Arbeitsgruppen verschickt. Die chromatographische Analytik und Probenvorbereitung wurde wie in 1.5 durchgeführt, das Chromatogramm physikalisch ausgewertet und anschließend postchromatographisch auf bakterientoxische Substanzen untersucht.

Auf dem Chromatogramm wird im Hinblick auf die Belastung der Alb mit antibiotisch wirksamen Substanzen deutlich, dass bereits die Alb 1 unmittelbar vor der Kläranlage Neurod mit antibiotisch wirksamen Substanzen belastet ist.

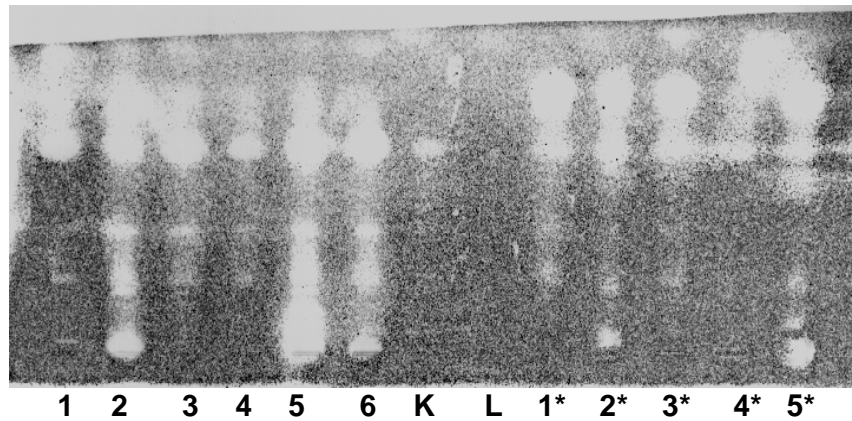


Abb 4: Gegenwart von antibiotisch wirksamen Substanzen in der Alb

1-5 = Probestellen Alb 1 bis Alb 5 , K unbelastete Wasserprobe, L Leerbahn

(* Methanolische Extrakte der Trockenmasse aus 40 mL nativer Wasserprobe)

Bei der Alb 2 erfolgt ein stärkerer Eintrag von Antibiotika über die Kläranlage. Diese Belastung wird bis zur Alb 5, dem Einlauf der Kläranlage Neureut, verdünnt und erfährt eine starke Zunahme dieser Wirkstoffe durch den Kläranlageneintrag Neureut. Abbildung 4 macht deutlich, dass die Haupteintragsquellen für Antibiotika in die Oberflächengewässer die Ausläufe der kommunalen Kläranlagen sind.

Durch die Zuordnung von Referenzsubstanzen kann im Bereich der Startpunkte des Chromatogramms die Anwesenheit von Tetracyclinen vermutet werden.

1.7 Nachweis funizider bzw. antimykotischer Wirkstoffe in Gewässerproben

Wirkstoffe zur Behandlung von Pilzinfektionen werden in der Humanmedizin als Antimykotika und im Pflanzenschutz als Fungizide bezeichnet. Unter Fungiziden versteht man Substanzen, die das Wachstum von Pilzen hemmen (Fungistatika) oder völlig unterbinden (Fungizide).

Fungizide sind Stoffe zur Vorbeugung und Bekämpfung von Pilzen. Fungizide werden überwiegend im Pflanzenschutz, aber auch bei Farben, Lacken, dem Holzschutz und im Papierschutz eingesetzt.

Hier erfährt die wirkungsbezogene Analytik mit der AMD/HPTLC eine besondere Bedeutung, da somit die Gegenwart fungizider Wirkstoffe in Oberflächengewässern und Abwässern erfasst werden kann. Dies erfolgt durch einen biologischen Test auf dem Chromatogramm, der die Wachstumshemmung von Pilzsporen oder eines Hefestammes erfasst.

Gegenwart von fungizid wirkenden Substanzen im Flussprofil der Alb (1-6) vom 13.10.99

Bei den untersuchten Wasserproben wurden im Juli 99 und Oktober 99 je 1 L Wasserprobe bei den Probestellen Alb 1 – Alb 5 gezogen und gekühlt zu den einzelnen Arbeitsgruppen verschickt. Die chromatographische Analytik und Probenvorbereitung wurde wie in 1.5 durchgeführt, das Chromatogramm physikalisch ausgewertet und anschließend postchromatographisch auf fungizide bzw. antimykotische Substanzen untersucht.

Neben dem Einsatz von Penicilliumsporen hat sich der Hefestamm - *Rhodotorula rubra* ATCC 70403 - als sehr geeigneter Testorganismus gezeigt, der bei gutem Wachstum auf der Dünnschichtplatte (24 h) eine rote Eigenfärbung aufweist. Bei Anwesenheit eines fungiziden Wirkstoffes erscheint ein weißer Hemmhof, dessen Größe bestimmt wird durch die applizierte Menge und durch die Wirkungsspezifität des Fungizids.

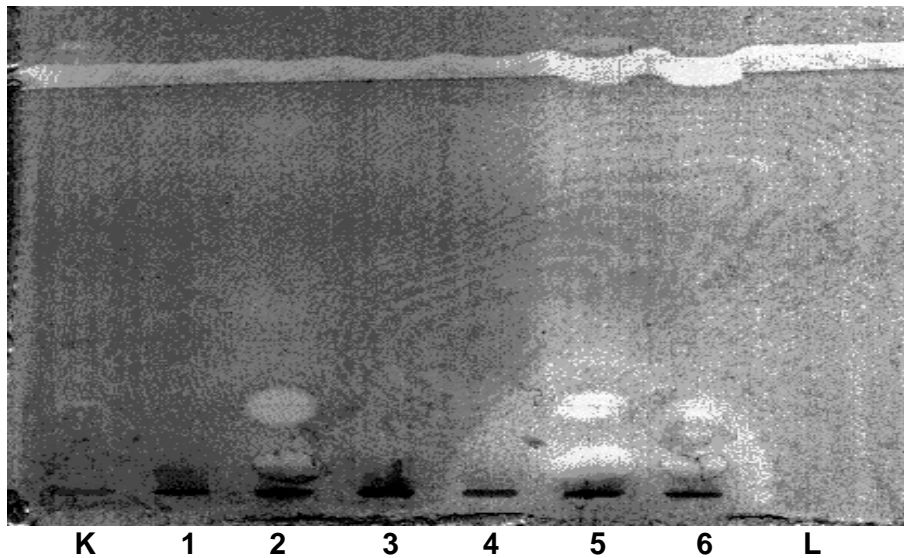


Abb 5: Gegenwart von antimykotisch wirksamen Substanzen in der Alb
 1-5 = Probestellen Alb 1 bis Alb 5 , K unbelastete Wasserprobe, L Leerbahn
 (Detektionsorganismus *Rhodotorula rubra* ATCC 70403)

Wie bei dem Eintrag von Antibiotika durch die Kläranlagen in das Oberflächengewässer erfolgt auch bei der Alb 2 erfolgt ein stärkerer Eintrag von Fungiziden bzw. Antimykotika über die Kläranlage in die Alb. Diese Belastung wird bis zur Alb 5, dem Einlauf der Kläranlage Neureut, verdünnt und erfährt eine starke Zunahme dieser Wirkstoffe durch den Kläranlageneintrag. Inwieweit es sich bei einem kommunalen Abwasser um Fungizide oder um antimykotische Pharmaka handelt, kann mit dieser Methode nicht entschieden werden.

Der Einsatz der wirkungsbezogenen Analytik in Bezug für die Detektion von fungiziden Wirkstoffen in Oberflächengewässern (Saar – Mosel –Gebiet)

Azol-Fungizide zählen zu einer der wichtigsten Wirkstoffgruppen im Pflanzenschutz und werden vor allem im Getreide- sowie im Obst- und Weinbau eingesetzt und. Azol-

Derivate besitzen aber auch bei der Behandlung von systemischen Pilzinfektionen des Menschen eine besondere Bedeutung, da diese Wirkstoffe im Vergleich zu anderen Verbindungen (z.B. Amphotericin B) weniger toxisch und daher häufig die einzige therapeutische Alternative sind.

Die Einführung der Azol-Derivate im Pflanzenschutz erfolgte Anfang der 70er Jahre und fand praktisch parallel zur Entwicklung der Azol-Antimykotika gegen humanpathogene Pilze statt.

Generell werden in der Humanmedizin und im Pflanzenschutz nicht dieselben Derivate aus dieser Substanzgruppe eingesetzt, die Wirkstoffe verfügen aber über identische Wirkungsmechanismen und werden somit von denselben Resistenzmechanismen der Pilze neutralisiert. (BGVV 2001)

Da im Hinblick auf den vorbeugenden Gesundheits- und Verbraucherschutz die möglichen Auswirkungen der Azol-Anwendung im Pflanzenschutz auf die Resistenzwirkung potentiell humanpathogener Pilze abgeklärt werden soll, besteht innerhalb der internationalen Saar Mosel Kommission (IKSMS) ein großes Interesse, die mögliche Anwesenheit von Azol-Fungiziden zunächst in den Oberflächengewässern im Raum Luxemburg, Frankreich, Rheinland Pfalz und dem Saarland zu erfassen.

Chromatographische Auftrennung und „Fingerprint“ der Wasserprobe

Aufgrund des noch geringen Anteils an Biomasse in den Wasserproben vom 15-17.05.00 konnte auf dem Chromatogramm mit Hilfe des Mehrwellenlängenscans (200 nm – 320 nm) durch signifikante Peaks die chromatographischen „Fingerprints“ der Wasserproben aus den einzelnen Regionen, wie Frankreich und Luxemburg und Saarland sowie aus Rheinland Pfalz gut unterschieden werden.

Diese Unterschiede konnten während des gesamten Untersuchungszeitraumes beobachtet werden.

Nach der physikalischen Auswertung wird einerseits als Bestätigung für die mögliche Identifizierung von Fungiziden und andererseits für die Erfassung noch nicht dedektierter Wirkstoffe postchromatographisch mit Penicilliumsporen auf Fungizide hin untersucht.

In Tabelle 1 werden die Pestizide aufgelistet, die sowohl nach der physikalischen Auswertung anhand der vorliegenden Spektrenbibliothek als auch nach dem postchromatographischen Biomonitoring (s. Abb. 6) in den jeweiligen Wasserproben mit weiteren Bestätigungsmethoden (z.B. GC/MS) analysiert und quantifiziert werden könnten.

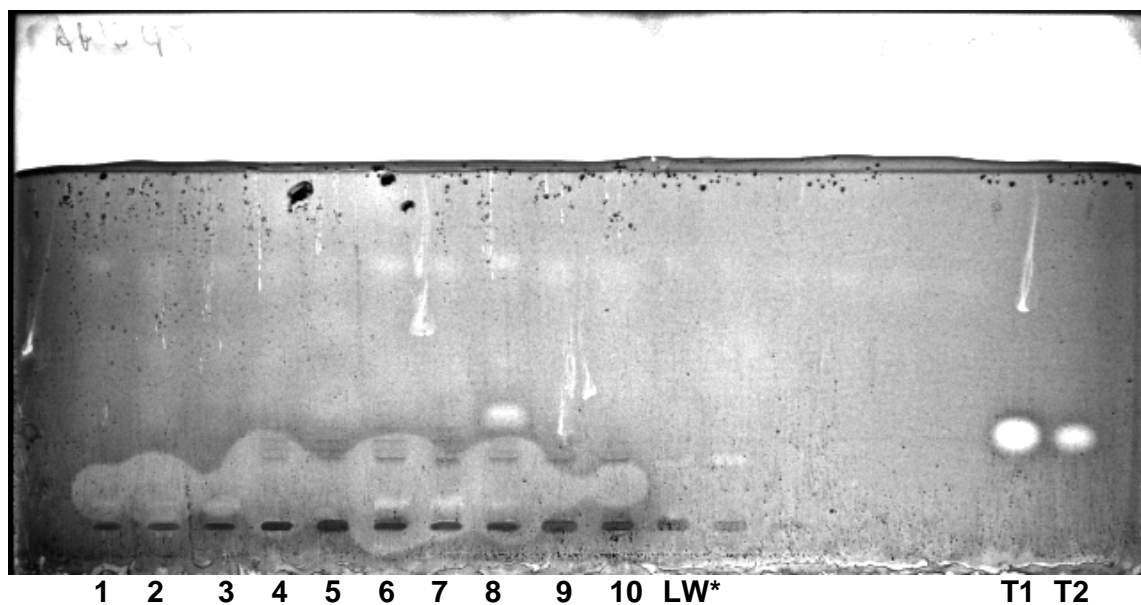


Abb. 6 Wirkungsbezogene Analytik zur Bestimmung von Fungiziden

1-3 Luxemburg, 4-7 Frankreich, 8-10 Saarland, LW Leerwert

T1, T2 Standards von Tebuconazol 20 ng, 10 ng)

Testorganismus postchromatographisch: Penicillium spec.

Abbildung 6 macht die Anwesenheit von 2-3 Fungiziden in den Proben 1-10 wahrscheinlich. Bei der Suche nach den entsprechenden Schadstoffen können zahlreiche Fungizide wie z.B. Procymidon, Vinclozolin Captafol, Chlozolinat u.a. ausgeschlossen werden, da ihre Lage im Chromatogramm nicht den hier detektierten Stoffen entspricht. Die sehr

zeit- und kostenaufwendige Einzelstoffanalytik auf Fungizide kann mit diesem Verfahren weitgehend eingegrenzt werden.

Diese Proben sollten insbesondere auf Carbendazim, Imazalil, Bitertanol u.ä und bei der Probe 8 besonders auf Azole hin untersucht werden.

Die Nachweisgrenze von Tebuconazol mit Hilfe der wirkungsbezogenen Analytik in der AMD – HPTLC beträgt 5 ng/pro Fleck bei *Penicillium expansum* als Detektionsorganismus.

Tab.1: Mögliche Fungizide in Oberflächengewässern nach der wirkungsbezogenen Analytik

Land	Fluss	Probestelle	Mögliche Fungizide
Luxemburg	Sauer	Wasserbillig	Imazalil, Fenpropidin (Met.)
Luxemburg	Alzette	Ettelbruck	Imazalil, Fenpropidin (Met.), Benalaxyl
Luxemburg	Wiltz	Tutschemillen	Imazalil, Fenpropidin (Met.), Benalaxyl
Frankreich	Mosel	Millery	Benalaxyl, Iprodion, Propiconazol, Carbendazim
Frankreich	Saar	Keskastel	Fenpropimorph oder Benalaxyl, Iprodion
Frankreich	Mosel	Chatel Nomexy	Benalaxyl, Isoproteron o. Metoxuron, Carbendaz., Iprod.
Frankreich	Meurthe	Azerailles	Benalaxyl, Isoproteron o. Metoxuron, Carbendaz., Iprod.
Rheinl. – Pfalz	Saar	Kanzem	Carbendazim, Imazalil, Benalaxyl
Rheinl. – Pfalz	Mosel	Frankel	Carbendazim, Imazalil
Rheinl. – Pfalz	Mosel	Palzem	Carbendazim, Imazalil
Rheinl. – Pfalz	Mosel	Koblenz	Carbendazim, Imazalil
Saarland	Nied	Niedaltdorf	Carbendazim, Imazalil, Epoiconazol
Saarland	Saar	Güdingen	Carbendazim, Imazalil
Saarland	Saar	Fremersdorf	Carbendazim, Imazalil

Bei Untersuchungen in Rheinland - Pfalz an Oberflächengewässern und Kläranlagen wurde festgestellt, dass die meisten Pflanzenschutz-Wirkstoffe in sogenannten "Peaks",

das sind Spitzen, innerhalb des Jahres auftreten, um dann in Ihrer Konzentration wieder sehr stark zurückzugehen bzw. unter der jeweiligen Nachweisgrenze zu liegen. Dies legt den Schluss nahe, dass immer noch nicht alle Spritzen im Feld gereinigt werden und so hohe Wirkstoffmengen über die Kanalisation in die Kläranlagen gelangen. Dort werden sie nicht abgebaut und gelangen in die Gewässer.

Einige Stoffe können jedoch ganzjährig nachgewiesen werden, wie z.B. Isoproturon (= IPU, der Gräserwirkstoff), Diuron (z.B. Vorox G, Rapir WG) und Tebuconazol (Getreide- und Weinbau-Fungizide). (AUGUSTIN 2002)

1.8 Nachweis von Inhibitoren der Cholinesterase in Wasserproben

Die Cholinesterasehemmung ist eine schon lang bekannte biochemische Methode zum Nachweis der enzyminhibitorischen Wirkung von Organophosphorsäureestern und insektiziden Carbamaten. Diese Wirkstoffe sind als Schädlingsbekämpfungsmittel weit verbreitet und haben teilweise die persistenteren Insektizide vom Typ der chlorierten Kohlenwasserstoffe ersetzt. Phosphorsäureester und Carbamate sind im Gegensatz zu den Organochlorverbindungen durch eine in vielen Fällen hohe akute Toxizität, eine geringe hydrolytische Stabilität und eine gute biologische Abbaubarkeit sowie eine relativ höhere Wasserlöslichkeit und größere Mobilität gekennzeichnet. Die Untersuchungen wurden an isolierten Enzymen und an Enzymhomogenaten durchgeführt (HERZSPRUNG 1991).

1.8.1 Die physiologische Bedeutung der Cholinesterase

Die Acetylcholinesterase nimmt eine Schlüsselfunktion in der Kontrolle der cholinergen Erregungsübertragung ein. Sie ist im synaptischen Spalt des peripheren und zentralen Nervensystems lokalisiert. Dort sorgt sie für den schnellen, hydrolytischen Abbau des Acetylcholins, das während der parasymphatischen Erregung im Überschuss gebildet wurde. Die Funktion lässt sich seit kurzem mit Hilfe der Kristallstrukturanalyse auf mole-

kularer Ebene erklären. Die Acetylcholinesterasen gehört zu der Gruppe der Serinhydro-lasen

Der molekulare Mechanismus der Cholinesterasehemmung

Die Hemmung der Cholinesterase beruht in der Regel auf einer irreversiblen Bindung des Inhibitors an die Serin-OH-gruppe im aktiven Zentrum des Enzyms. Die Phosphor-pestizide und insektiziden Carbamate z.B. inhibieren die Cholinesterase in sehr unterschiedlichem Ausmaß.

Die meisten irreversiblen Inhibitoren hemmen die enzymatische Reaktion vollständig z.T. durch Ausbildung einer kovalenten Bindung, wenn ihre Konzentration die der reaktions-fähigen Gruppen im Enzym übersteigt.

1.7.2 Nachweis von Inhibitoren der Cholinesterase im Flussprofil der Alb (1-6) vom 13.10.99

Es fällt auf, dass insbesondere der Kläranlagenauslauf (Alb5) mit Inhibitoren der Cholinesterase deutlich belastet ist. Obwohl in den in vitro Testverfahren der Arbeitsgruppe Obst im Verdünnungstest keine reversiblen Inhibitoren gemessen wurden, muss mit diesen Ergebnissen eine irreversible Hemmung der Esterasenaktivität angenommen werden, die hier in Abbildung 7 dokumentiert wurde.

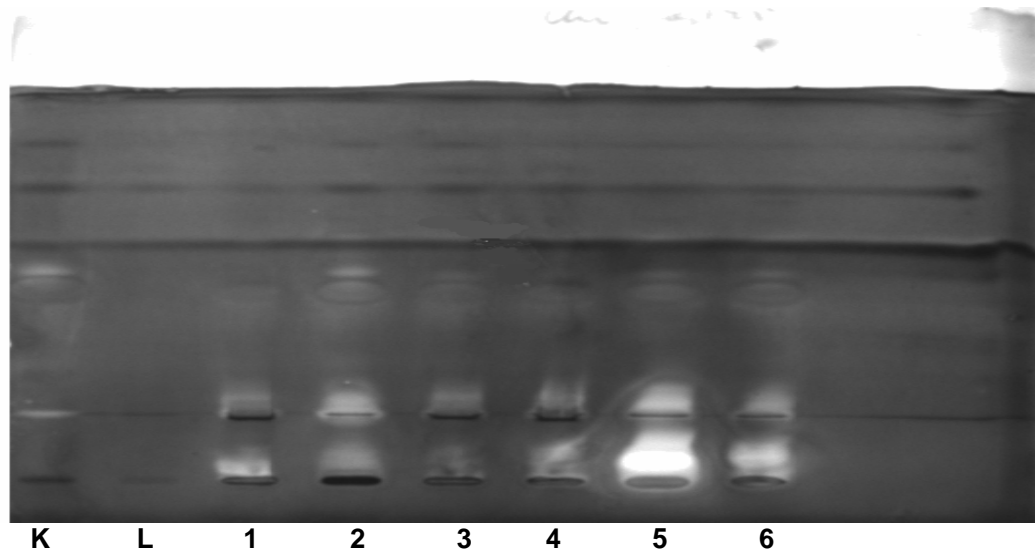


Abb 7: Gegenwart von Inhibitoren der Cholinesterase in der Alb

1-5 = Probestellen Alb 1 bis Alb 5 , K unbelastete Wasserprobe, L Leerbahn

Werden in 1.7 die Möglichkeiten aufgezeigt, wie auch Pestizide, die als Inhibitoren der Cholinesterase gelten, über die kommunalen Kläranlagen in die Oberflächengewässer gelangen können, so kann aber nicht der Verdacht ausgeräumt werden, dass auch mögliche Arzneistoffe wie z.B. Bambuterol und Terbutalin als Broncholytika, sowie cholinerge Parasympathomimetika wie Neostigmin und Tacrin, als die Ursache für die Hemmung der Cholinesterase in Frage kommen. Dieses gilt nachzuprüfen, da diese Stoffe ebenso wie Insektizide in den Ausläufen kommunaler Kläranlagen zu vermuten sind.

Die Nachweisgrenze von Tacrin im Cholinesterasehemmtest in der AMD – HPTLC beträgt 20 pg/pro Fleck.

Tab. 2: Abwasserrelevante Inhibitoren der Cholinesterase

Enzym	mögliche Schadstoffe bzw. Schadstoffklassen
Cholinesterase	insektizide Carbamate, insektizide Phosphorsäureester, Organochlorverbindungen und Metabolite Broncholytika (Bambuterol und Terbutalin), cholinerge Parasympathomimetika (Neostigmin Tacrin)

Bei der Überprüfung von Oberflächenwasserproben auf das mögliche Vorhandensein von Inhibitoren der Cholinesterase konnten in jeder Wasserprobe diese Hemmstoffe nachgewiesen werden. Die Intensität der toxischen Wirkung korrelierte mit der Einwohnerdichte an der entsprechenden Probestelle.

1.9 Leuchtbakterientest in Fraktionen eines Abwassers mit Biolumineszenz-Inhibitoren

Leuchtbakterien der Gattung *Vibrio* sind die Testorganismen der Wahl für die schnelle und exakte Erfassung toxischer Einflüsse von Flüssigkeiten und Feststoffen. Seit mehr als zehn Jahren werden Leuchtbakterien allgemein zur Messung der Toxizität von Wasserproben eingesetzt, beschrieben in der Norm EN ISO 11348 Teil 1 bis Teil 3: "Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest)".

Leuchtbakterien sind in der Lage, Stoffwechselenergie in Licht umzusetzen. Die Lichtemission ist dabei direkt an die Vitalität gekoppelt. Werden Leuchtbakterien mit toxi-

schen Stoffen konfrontiert, kommt es zu einer Verminderung der Leuchtintensität in Abhängigkeit von der toxischen Potenz dieser Stoffe.

Während das in vitro Testverfahren in der Regel die Summeneffekte von Schadwirkungen aufweist, ist eine Einzelstoffidentifizierung nicht möglich.

Die Ergebnisse der fraktionierten Extraktion eines Kokereiabwassers in Kombination mit der wirkungsbezogenen Analytik zeigen deutlich, in welchen Fraktionen die Toxine hauptsächlich zu finden sind, so dass eine anschließende Identifizierung oder auch Charakterisierung der Wirkstoffe möglich wird.

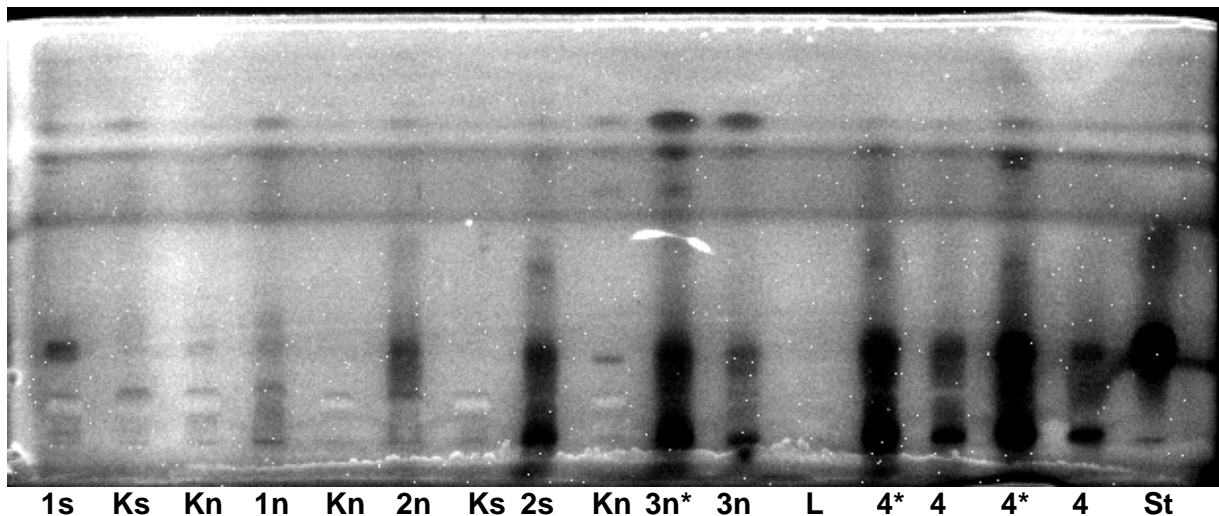


Abb. 8: Leuchtbakterientest auf dem Chromatogramm (Belichtungszeit 800 sec.)

1 Cyclohexanextrakte, 2 Chloroformextrakte, 3 Anreicherung über RP 18 Kartuschen,
4 methanolische Extrakte aus der Trockenmasse; St DCP/PCP 30 ng/Fleck; K =
Kontrolle; n = Wasserprobe neutral; s = Wasserprobe sauer bei pH 2

In Abbildung 8 können beim postchromatographischer Leuchtbakterientest auf dem Chromatogramm mit Dichlorphenol (DCP) bzw. Pentachlorphenol (PCP) als Referenzsubstanzen die Inhibitoren des Kokereiabwassers bei einer Belichtungszeit von 800 sec. mit einer CCD Kamera dokumentiert werden.

Die Wiederfindungsraten für Inhibitoren der Biolumineszenz steigen mit der Polarität der Extraktionsverfahren. In Abbildung 8 wird deutlich, mit welchem Anreicherungsverfahren die organischen Substanzen detektiert werden können, die für die Biolumineszenzhemmung verantwortlich sind. Eine direkte Messung einer nativen Kokereiabwasserprobe war aufgrund des hohen Salzgehaltes nicht möglich. In diesen Fraktionen konnte deutlich sichtbar PCP als ein Bestandteil der Biolumineszenzinhibitoren identifiziert werden.

1.10 Untersuchungsergebnisse der Alb 1 und Alb 5 Ultrafraktionen auf bioaktive Stoffe

Bei der Ultrafiltration (Abk.: UF) wird die Anschlußgrenze (E cut-off) auf die Molmasse anstatt auf die Partikelgröße bezogen. Sie spielt sich im Bereich von ca. 1000 bis 2 Mio. Dalton ab. Die UF wird im Prozeßbereich überwiegend dynamisch durchgeführt, d.h. mit Membranüberströmung. Dabei fällt neben dem Filtrat, auch Permeat genannt, noch das Konzentrat an.

Der Einsatz der wirkungsbezogenen Analytik mit der HTLC-AMD bietet die Möglichkeit, die Wirkung der Schadstoffe nicht nur in fraktionierten Extrakten einer Wasserprobe sondern auch in Ultrafiltraten mit einem definierten Bereich ihrer Molmasse zu verfolgen. So können diese Toxine einerseits hinsichtlich ihrer Molmasse aber auch hinsichtlich ihrer Polarität näher charakterisiert werden. Durch die physikalische Auswertung ist zunächst eine Differenzierung der einzelnen Fraktionen durch das Chromatogramm als Fingerprint möglich.

Als Modellproben für dieses Verfahren wurden Alb1 als verhältnismäßig unbelastete reale Wasserprobe und Alb5 als eine belastete reale Wasserprobe für die Fraktionierung der organischen Bestandteile hinsichtlich ihrer Molmassen ausgewählt.

1.10.1 Physikalische Detektion der Ultrafiltrate nach der Ultrafiltration

Durch die Auswertung mittels Mehrwellenlängenscans (200 nm bis 320 nm) konnte in den Fraktionen von Alb 5 die Wiederfindung mehrerer Xanthinderivate (Coffein seine Metaboliten) in den Fraktionen UF1 bis UF5 gemessen werden. Es zeigt sich eine „Verschleppung“ dieser Xanthinderivate mit einer Molmasse von 194 D durch alle Molekülsiebe (Filter 4 : 1-3 kD).

1.10.2 Nachweis von Cholinesterasen-Inhibitoren in Ultrafiltraten von Alb1 und Alb 5

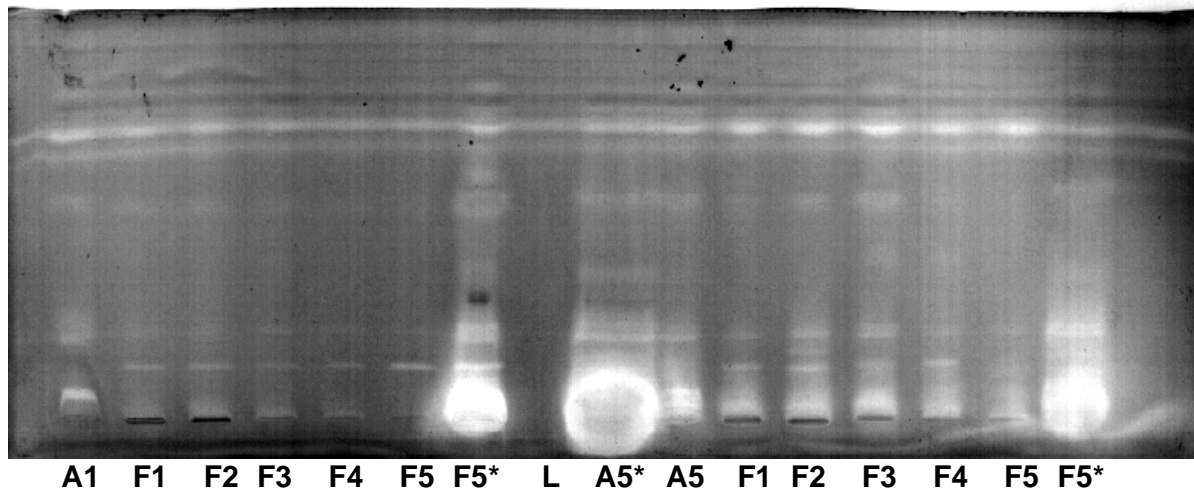


Abb. 9: Cholinesterasenhemmtest postchromatographisch in Ultrafiltraten von Alb1 und Alb 5

A1, A5 Original, F1-F5 Ultrafiltrate, L – Leerwert, * 10 fach konzentriert

Abbildung 9 zeigt sowohl in Alb 1 als auch in Alb 5 die Gegenwart von Inhibitoren der Cholinesterase. Eine Verschleppung dieser Toxine ist bis zu der Fraktion mit einer Molmasse < 1 – 3 kD deutlich zu erkennen, insbesondere bei der 10 fachen Konzentration im UF 5 der Alb 1 und Alb 5. Aufgrund der Lage im Chromatogramm bei einem Universalgradienten, der mit Acetonitril als polarste mobile Phase beginnt, erweisen sich die Inhibitoren als polare Komponenten, mit einer Löslichkeit in Methanol. Die relative Anrei-

cherung der Inhibitoren in UF 1 bis UF 3 sowohl in Alb 1 als auch in Alb 5 läßt den Schluß zu, daß diese Toxingruppe auch eine Assoziation an größere Moleküle aufweist, was auf die Möglichkeit der Ausbildung von Wasserstoffbrücken hindeutet.

Die Gegenwart von Tacrin in Alb 5, einem Medikament zur Behandlung der Alzheimer Krankheit, muss als sehr starker Inhibitor der Cholinesterase (Nachweisgrenze 20 pg/Fleck) als mögliche Verunreinigung im Spurenbereich diskutiert werden.

1.10.3 Nachweis von Biolumineszenz-Inhibitoren in Ultrafiltraten von Alb1 und Alb 5

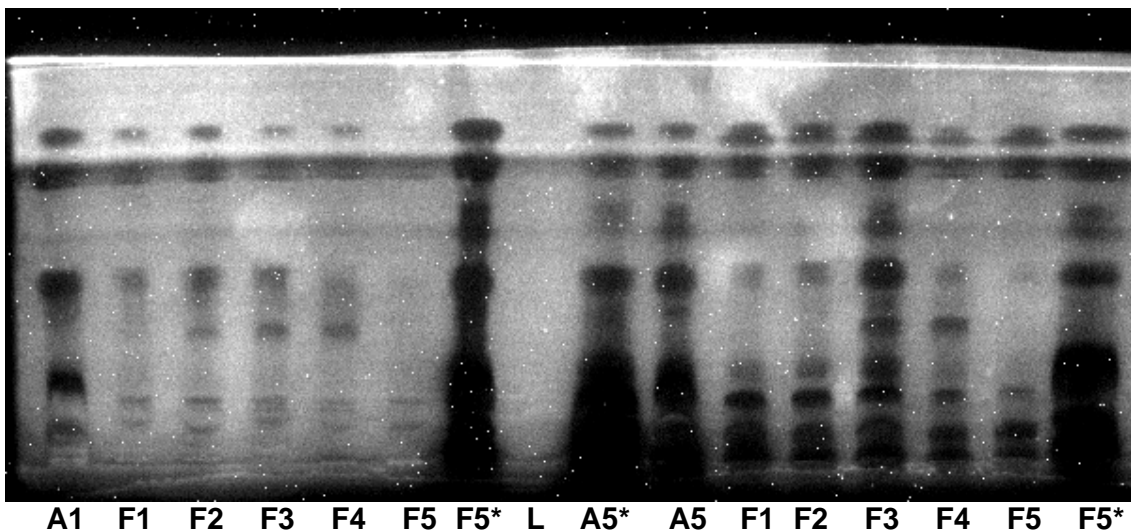


Abb. 10: Leuchtbakterientest postchromatographisch in Ultrafiltraten von Alb1 und Alb 5 (Belichtungszeit 800 sec)

A1, A5 Original, F1-F5 Ultrafiltrate, L – Leerwert, * 10 fach konzentriert

Die Luminometrie ist eines der nachweisstärksten Messverfahren überhaupt und liefert im Fall der Leuchtbakterien eine exakte, quantitative Erfassung toxischer Effekte. In Abbildung 10 werden eindrücklich eine Fülle toxischer Substanzen im polaren wie im unpolaren Bereich detektiert.

So erweist sich Alb 5 als weitaus belasteter als Alb 1 nicht nur hinsichtlich der Intensität an toxischen Stoffen sondern auch im auf Bezug die Anzahl gegenwärtiger Toxine. Während in diesem Verfahren deutlich wird, inwieweit polare Toxine über alle Fraktionen verschleppt werden (siehe 1.10.2) werden in diesem Testverfahren auch Biolumineszenz-Inhibitoren detektiert, die im mittelpolaren Bereich zu finden sind und im UF 3 bis UF 4 angereichert werden. Dies gilt für Proben der Alb 5 aber ebenso für die weniger belastete Wasserprobe Alb 1, eine Substanzgruppe, die in UF 5 nicht mehr zu detektieren ist. Hierbei können sowohl eine bestimmte Größe des Toxins oder aber auch die Fähigkeit zur möglichen Assoziation an größere Moleküle für diesen Effekt verantwortlich sein. Eine Assoziation des Toxins an eine größere Molmasseneinheit kann durch Wasserstoffbrückenbindung oder auch durch hydrophobe Wechselwirkungen bedingt sein. Aufgrund der Lage im Chromatogramm und der Remissionsmessungen kann die Gegenwart von phenolhaltigen Substanzen als sehr wahrscheinlich angesehen werden.

1.11 Bewertung der Ergebnisse

Nach DIN 4045 (12/1985) bezeichnet man den Begriff Abwasser als „nach häuslichem, gewerblichem od. industriellem Gebrauch verändertes, insbes. verunreinigtes, abfließendes, auch von Niederschlägen stammendes u. in die Kanalisation gelangendes Wasser“. Je nach Herkunft unterscheidet man zwischen Roh-, Schmutz-, Niederschlags-, Fremd-, Kühlwasser sowie Mischabwasser. Roh-Abwasser ist das einer Kläranlage zufließende, unbehandelte Abwasser.

Abwässer gehören zu den kompliziertesten Vielstoffgemischen mit einem breiten Spektrum der verschiedensten Inhaltsstoffe (Salze, Fette, Eiweißstoffe, Kohlenhydrate, Lsm., Detergentien, Mikroorganismen, Sand, Holz u.a.), die gelöst, kolloidal, fein- oder grobdispers sowie in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen können. Je nach ihrer Dichte kommen die dispergierten Stoffe als Schwimm-, Schweb- od. Sinkstoffe vor. Häusliche Abwässer, zu denen auch die Krankenhausabwässer gehören, fallen aus Spül-, Wasch- bzw. Reinigungsarbeiten sowie aus der Benutzung sanitärer Anlagen an.(RÖMPP 1990)

Die wirkungsbezogene Analytik mit der HPTLC-AMD hat sich als ein geeignetes Verfahren für eine Risikoanalytik und Risikobewertung im Umweltmanagement erwiesen. Die Einzelstoffanalytik ist bei dem Versuch, ein umfassendes Bild über möglichen Risiken in einer Wasserprobe zu erhalten, überfordert. Die Zu- und Abläufe der kommunalen Kläranlagen enthalten als ein Vielstoffgemisch anthropogenen Ursprungs neben zahlreichen Krankheitskeimen und Viren eine Vielzahl physiologisch wirksamer Substanzen (wie z.B. Antibiotika, endokrin wirksame Substanzen)

Durch die Weiterentwicklung neuer Technologien haben Chemiker und Ingenieure eine stürmische Entwicklung im Bereich der Elimination von verschiedenen Schadstoffen aus

dem Abwasser eingeleitet. Dennoch erscheinen viele membrangesteuerten, photochemischen oder katalytische Oxidationsprozesse im Abwasser noch zu komplex, um mit Sicherheit eine Eliminierung eines potentiellen Risikos für die menschliche Gesundheit postulieren zu können. Prozessbedingte Synthesen neuer Toxine können bei diesen Verfahren nicht ausgeschlossen werden und bedürfen der Überwachung.

Nur durch das stete Ineinandergreifen von epidemiologischen, mikrobiologischen, biologischen, molekularbiologischen und chemisch/physikalischen Verfahren und mit einer interdisziplinären Vorgehensweise wird eine umfassendere Risikoanalytik möglich sein, umfassender als die Verantwortlichen sie bisher zur Verfügung hatten. Die wirkungsbezogene Analytik in ihrer Kombination aus chemisch/physikalischen Anteil gekoppelt mit toxikologisch relevanten Wirktesten eröffnet ein sinnvolles Konzept für die Zukunft, um Schädwirkungen vorausschauend von Mensch und Natur fernzuhalten.

1.12 Literatur

Augustin, Dr., Pflanzenschutzmittel in Oberflächengewässern und EU – Wasserrahmenrichtlinie, slva Oppenheim, Mainzer Pflanzenschutztag am 15.01.2002

bgvv; Bundesinstitut für gesundheitlicher Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Sachstandsbericht zur Problematik der Entwicklung von Resistenzen humaner Mykosen gegenüber Azol-Antimykotika und eventueller Wechselwirkungen mit den als Fungizid eingesetzten Pflanzenschutzmitteln vom 7.6.2001

Burger K., (1988) Multimethode zur Ultraspurenbestimmung: Pflanzenschutzmittelwirkstoffe in Grund- und Trinkwasser, analysiert durch DC/AMD (Automated Development), Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 41, 173-224

Feuerpfeil, I; López-Pila J.; Schmidt R. Schneider E.; Szewzyk R. (1999) Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt, Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 42; 37-50 Springer Verlag

Hamburger O. M. and Cordell G. A., (1987) A Direct Bioautographic TLC Assay for Compounds Possessing Antibacterial Activity, Journal of Natural Products, 50, 25-29

Hermanns B., (1995) Wirkungsspezifische Detektion: Detektion von herbiziden Wirkstoffen in Dünnschichtchromatogrammen, Diplomarbeit an der Fachhochschule Aachen Abt. Jülich (Prof. Dr. Jeromin)

Herzprung P (1991), Methodische Grundlagen des Nachweises und der Bestimmung von insektiziden Phosphorsäureestern und Carbamaten im Wasser mittels Cholinesterasehemmung, Graduation Technische Universität München (Prof. Nießner)

Hostettmann K, Terreaux C.; Marston A.; Potterat O. (1997) The Role of Planar Chromatography in the Rapid Screening and Isolation of Bioactive Compounds from Medicinal Plants, *Journal of Planar Chromatography*, 10, 251-257

Mendoza, G.E; Schields, J.B.(1973) Determination of some carbamates by enzyme inhibition techniques using thin layer chromatography and colorimetry, *J. Agric. Food Chem.* 21, 178-184

Römpp Lexikon Umwelt, S.24. Imhoff, Taschenbuch der Stadtentwässerung, München: Oldenbourg 1990. allg.: Ullmann (5.) Band 8, 1–152.

Weins, C.and Jork, Hellmut (1996) Toxicological Evaluation of Harmful stances by in situ Biological and Biochemical Detection in High Performance Thin-Layer Chromatography, *Journal of Chromatography*, 750 403-407