

Abschlussbericht

**Agrobiotechnisches Verfahren zum Abbau antibiotischer Wirkstoffe in
Wirtschaftsdünger und geeignete Messmethodik**

Kooperation ABIOTEC

2016 LFE 0002

Koordinator:

Materialforschungs- und -prüfanstalt Weimar
Dr. E.- Peter Kulle
Coudraystraße 9
99423 Weimar



Partner:

Institut für Biogas, Kreislaufwirtschaft und Energie
Prof. Dr.- Ing. Frank Scholwin
Steubenstraße 15
99423 Weimar



Institut für Umweltmedizin Labor
Dipl.- Biol. Rainer Stumm
Heinrich-Heine-Straße 3
99096 Erfurt



MPG Milchproduktion Am Stadtberg GmbH & Co. Biogas KG
Markus Reiter
Fumbach 143
37308 Bodenrode-Westhausen

Thüringer Aufbaubank
Bereich Agrarförderung, Infrastruktur, Umwelt
Gorkistraße 9
99084 Erfurt



Unterschrift:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Kulle', with a stylized, cursive script.

Dr. E.- Peter Kulle
Projektleiter Kooperation ABIOTEC

Weimar, 20.03.2020

Inhalt

| | |
|---|----|
| Abkürzungsverzeichnis | 4 |
| 1. Einleitung | 6 |
| 2. Zielstellung | 10 |
| 3. Material und Methoden | 11 |
| 3.1 Recherche | 11 |
| 3.2 Auswahl der Antibiotika | 11 |
| 3.3 Entwicklung geeigneter LC-MS – Messmethodik | 11 |
| 3.4 Agrobiotechnologische Verfahrensentwicklung und Abbaubersuche | 12 |
| 3.5 Mikrobiologische Bewertung und Entwicklung einer Prüfroutine | 14 |
| 3.6 Wirtschaftlichkeitsabschätzung | 15 |
| 3.7 Internationaler Workshop | 15 |
| 4. Ergebnisse und Diskussion | 16 |
| 4.1 Recherchen zum Antibiotika-Einsatz in der Praxis | 16 |
| 4.2 Entwicklung und Validierung der Messmethode | 18 |
| 4.3 Probenvorbereitung | 18 |
| 4.4 Normentwurf | 18 |
| 4.5 Vergleichsmessungen zur Methodvalidierung des Screeningverfahrens | 19 |
| 4.6 Laborversuche zum Abbau von Antibiotika | 23 |
| 4.7 Kleintechnische Versuche | 30 |
| 4.8 Mikrobiologische Untersuchungen | 32 |
| 4.9 Wirtschaftlichkeitsabschätzung | 37 |
| 4.10 Internationaler Workshop | 38 |
| 5. Schlussfolgerungen und Ausblick | 39 |
| 6. Zusammenfassung | 42 |
| 7. Literaturverzeichnis | 43 |
| Danksagung | 47 |
| Anhang | 48 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| a | Jahr |
| Abb. | Abbildung |
| BMBF | Bundesministerium für Bildung und Forschung |
| BVL | Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit |
| ct | Cent |
| dot | dotiert |
| dt | Dezitonne |
| ELER | Europäischer Landwirtschaftsfonds für die Entwicklung des ländlichen Raums |
| EMA | European Medicines Agency |
| et al. | et alii (deutsch: und andere) |
| € | Euro |
| FKZ | Förderkennzeichen |
| g | Gramm |
| GC | Gaschromatographie |
| ggf. | gegebenenfalls |
| GKZ | Gesamtkeimzahl |
| GPC | Gel-Permeations-Chromatographie |
| h | Stunde |
| ha | Hektar |
| HPLC | High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitchromatographie) |
| HR-LCMS | High resolution liquid chromatography mass spectrometry |
| HTK | Hühnertrockenkot |
| IBKE | Institut für Biogas, Kreislaufwirtschaft und Energie |
| inkl. | inklusive |
| IUML | Institut für Umweltmedizin, Labor |
| kg | Kilogramm |
| l | Liter |
| LC | Liquid chromatography (Flüssigkeitchromatographie) |
| LFE | Förderung der Zusammenarbeit in der Land-, Forst- und Ernährungswirtschaft |
| m | Meter |
| m ² | Quadratmeter |
| m ³ | Kubikmeter |
| MFPA | Materialforschungs- und -prüfanstalt |
| µg | Mikrogramm |
| mg | Milligramm |
| Mig | Migration |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| n | Anzahl |
| NLWKN | Niedersächsischer Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz |

| | |
|---------|--|
| % | <i>Prozent</i> |
| RiMi | <i>Rindermist</i> |
| RiGR | <i>Rindergärrest</i> |
| RiGü | <i>Rindergülle</i> |
| rpm | <i>Umdrehungen pro Minute</i> |
| SG | <i>Schweinegülle</i> |
| S / Str | <i>Stroh</i> |
| SPE | <i>solid phase extraction</i> |
| TAB | <i>Thüringer Aufbaubank</i> |
| Tab. | <i>Tabelle</i> |
| TLL | <i>Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft</i> |
| TLLLR | <i>Thüringer Landesamt für Landwirtschaft und Ländlichen Raum</i> |
| TLV | <i>Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz</i> |
| TM | <i>Trockenmasse</i> |
| TMIL | <i>Thüringer Ministerium für Infrastruktur und Landwirtschaft</i> |
| u.a. | <i>unter anderem</i> |
| UBA | <i>Umweltbundesamt</i> |
| undot | <i>undotiert</i> |
| UV | <i>Ultraviolett</i> |
| VDLUFA | <i>Verband deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten</i> |
| vgl. | <i>vergleiche</i> |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |
| z.B. | <i>zum Beispiel</i> |

1. Einleitung

In der modernen landwirtschaftlichen Tierhaltung werden antibiotische Wirkstoffe zum Schutz der Tiere therapeutisch eingesetzt. Ohne die Nutzung von Antibiotika wäre eine hoch produktive Intensivtierhaltung nicht möglich, da das Infektionspotential relativ erhöht ist. Die verwendeten Wirkstoffe werden zu einem großen Teil zusammen mit Transformationsprodukten von den Tieren ausgeschieden und gelangen durch Gülle, Jauche und Festmist direkt bzw. indirekt über die Gärbehälter der Biogasanlagen (Gärreste) nach Ausbringung auf die Böden. Bei der stofflichen Nutzung der Düngemittel können die enthaltenen antibiotischen Wirkstoffe sowie deren Metaboliten ggf. in den Wasserkreislauf also auch in das Grundwasser gelangen. Einzelne Studien haben gezeigt, dass Antibiotika aus der Tierhaltung mittlerweile im Grundwasser nachweisbar sind (UBA, Texte 27/2014). Besonders Antibiotika aus den Stoffgruppen der Tetracycline, Sulfonamide und β -Lactame konnten in Regionen mit intensiver Tierhaltung nachgewiesen werden.

Die Abbildung 1 veranschaulicht die abgegebenen Mengen von Veterinärantibiotika in Deutschland aufgeteilt in Regionen (BVL, 2019).

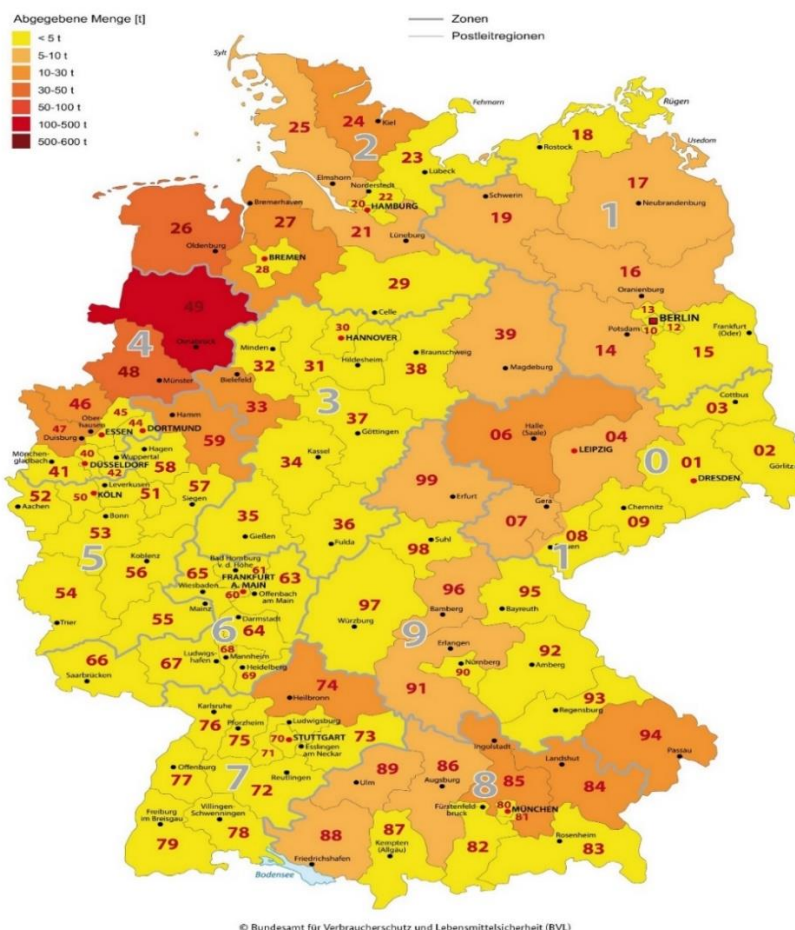


Abb. 1.1: Abgabemengen von Veterinärantibiotika in Deutschland (BVL, 2019)

Die dargestellte Zonierung hinsichtlich der Abgabemengen von Veterinärantibiotika in Deutschland weist auf die Schwerpunktregionen, wie z.B. in Nordwestdeutschland hin, in denen hohe Tierbesatzdichten bezogen auf die verfügbare landwirtschaftliche Nutzfläche zu verzeichnen sind. Aber auch Regionen in Ostdeutschland und im Süden Deutschlands sind auffällig.

Aufgrund der **hohen gesundheitlichen Relevanz** und (umwelt)**politischen Brisanz** des Themas einerseits und der Tatsache, dass es bisher keine genormte Analytik auf Antibiotika in den genannten Matrices gibt, und die starke Probenmatrix eine analytische Bestimmung extrem erschwert, müssen Möglichkeiten für die sichere qualitative und quantitative Bestimmung von Antibiotika in Gärresten, Gülle, Jauche und Festmist erarbeitet werden, die in Europa – wahrscheinlich auch weltweit – bisher nicht verfügbar sind (*Farre' et al., 2008; Tolzin-Banasch et al., 2015*).

In den unterschiedlichen Umweltkompartimenten unterliegen Antibiotikarückstände sehr vielfältigen Transport-, Akkumulations- und Metabolisierungsprozessen (*Hamscher und Mohring, 2012; Tolzin-Banasch et al., 2015*). Diese sind wissenschaftlich kaum oder nur in ersten Ansätzen geklärt (vgl. *Abb.1*). Andererseits ist die Entwicklung und Validierung von Multimethoden, respektive auch Einzelmethode, zur Bestimmung von Antibiotikarückständen in verschiedenen und komplexen Matrices sehr anspruchsvoll und zeit- und personalintensiv (*Perez-Carrera et al., 2010; Ratsak et al., 2013; Tolzin-Banasch et al., 2015*). Es gibt bisher europa- und weltweit keine bekannten gesicherten und normierten Messmethoden für Antibiotika sowie deren Metaboliten in den genannten Matrices. Bei der Erarbeitung und Validierung einer bundesweit einheitlichen Standardmethode für die Analyse von Veterinärantibiotika in Futtermitteln im Rahmen des VDLUFA ist die TLL als beratender Partner im Vorhaben federführend beteiligt. Insbesondere der bilanzierte Abbau der Substanzen in den genannten Matrices wurde noch nicht untersucht. Das Projekt versteht sich als praxisrelevante Vertiefung und Ergänzung der „*Thüringer Antibiotikastudie*“, die u.a. die Methodenentwicklung für die messtechnische Erfassung von Antibiotika zum Inhalt hatte (*Tolzin-Banasch et al., 2015*).

Es hebt sich vom BMBF- Verbundprojekt RiskAGuA („*Risiken durch Abwässer aus der intensiven Tierhaltung für Grund- und Oberflächenwasser in Agrarräumen*“, FKZ: 02WRS1274A-D) deutlich ab, das im Rahmen des Förderschwerpunktes RiSKWa gefördert wurde. Dabei wurde die Elimination von Spurenstoffen in flüssigen Gärrestanteilen im Zusammenhang mit einer sehr kostenintensiven Technologie (Strahlzonen- Schlaufenreaktor und Membransysteme/ Umkehrosmose) untersucht. Im Bereich der Wasserwirtschaft wird außerdem an technischen Verfahren wie UV- Bestrahlung und Ozonierung gearbeitet (*Sukul et al., 2008; Oller et al., 2011; Zhuang et al., 2015*). Eine für die spätere praxisnahe Umsetzbarkeit der Ergebnisse des hier vorgeschlagenen Projektvorhabens wesentliche Überlegung war, den Agrarbetrieben ein Verfahren und Prozedere zur Verfügung zu stellen, das einfach, kostengünstig und robust mit eigenen Kapazitäten realisier- und betreibbar ist.

Erste wissenschaftliche Untersuchungen zeigen, dass allein aufgrund der strukturellen Vielfalt und Heterogenität der eingesetzten Antibiotika eindeutige Prozessbedingungen für einen (gesicherten) gleichmäßigen **anaeroben** (Teil-)Abbau der Mehrheit aller Substanzen kaum festgelegt werden können (*Mogensen et al., 2003; Arikian et al., 2008; Mitchell und Frear, 2015; Bertelkamp et al., 2016*). Nach *Spielmeyer (2019)* gibt es während anaerober Biogasprozesse keinen Abbau bei Sulfonamiden und Tetrazyklinen.

Die strukturelle Komplexität der Substanzen bewirkt überdies eine Vielzahl von theoretisch möglichen, (mikro)biologischen Abbaupfaden, wodurch zahlreiche chemische Verbindungen als Abbaumetabolite denkbar sind, was wiederum die Kalkulierbarkeit der zu erwartenden und zu verarbeitenden Substanzen erschwert. Die „anaerobe Behandlung“ der Antibiotika in der Biogas-anlage, welche sozusagen als Nebeneffekt automatisch erfolgt, kann sich einerseits als Chance zur (Teil-)Eliminierung im Bioenergiesystem erweisen und damit einen wichtigen Baustein zur Vermeidung von Folgeschäden darstellen, andererseits reicht sie bei Weitem nicht aus (*Carballa et al., 2007; Alvarez et al., 2010*). Verschiedene Forschungsarbeiten zeigen mittlerweile den Abbau verschiedener anthropogener Spurenstoffe in **aerobem** Milieu (*Kümmerer et al., 2000; Teeter und Meyerhoff, 2003; UBA, 2014; Taheran et al., 2016; Nicoloff und Andersson, 2016; Leathers et al., 2017; Selvam und Wong, 2017; Reis et al., 2020 Teil, Teil II*).

Eine entsprechende aerobe oder anaerobe Gärrestaufbereitung ist also sinnvoll und notwendig. Durch die Fest-Flüssigtrennung der Gärrückstände und Gülle im Vorfeld der Aufbereitung wird es möglich sein, Rückschlüsse auf Verbleib und Mobilität der verschiedenen Schadstoffe zu ziehen, also ob diese suspendiert, partikelgebunden oder desorbiert sind.

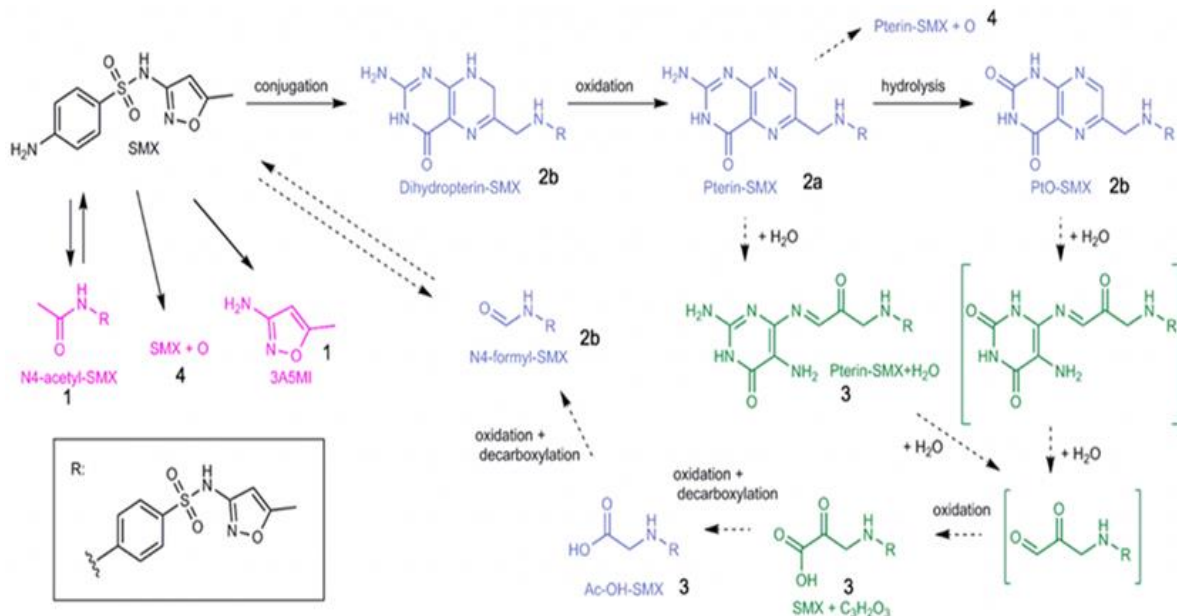


Abbildung 1.2: Biotransformation von Sulfonamid Antibiotika (Achermann et al., Environ. Sci. Technol., 2018)

Letztlich bergen Antibiotika und deren Abbauprodukte in der Umwelt aufgrund nicht kalkulierbarer Restkonzentrationen ein schwer abzuschätzendes Gefahrenrisiko im Hinblick auf mögliche humanpathologische und ökosystemare Spätfolgen (Thiele-Bruhn, 2003; Boxall et al., 2004; Kümmerer, 2008, 2010; Hammesfahr et al., 2011; Marshall und Levy, 2011; Jechalke et al., 2013; UBA, 2014; Bengtsson-Palme und Larsson, 2015; WHO, 2015; Woolhouse et al., 2015; Christou et al., 2017a; Gaze und Depledge, 2017; Thiele-Bruhn, 2019).

So können Spezies-übergreifende Auswirkungen in Form von Schädigungen der Nahrungsnetze niederer Organismengruppen (Boden, Grundwasser) bis hin zum Auftreten von Resistenzen von Mikroorganismen unverkennbare Resultate des Anreicherungsprozesses derartiger Substanzen sein (Halling-Soerensen et al., 1998; Woolhouse und Ward, 2013; de Jong et al., 2014; Woolhouse et al., 2015; NLWKN, 2016; Ternes et al., 2017; Deutscher Bundestag, 2018; Westphal-Settele et al., 2018). Es herrscht teilweise große Verunsicherung, eine Relativierung und Versachlichung des Problems ist dringend geboten.

In Tabelle 1 sind die Antibiotika-Abgabemengen für Deutschland bezogen auf die Wirkstoffklassen in den Jahren 2011 – 2018 gegenübergestellt (BVL, 2019). Neben dem sukzessiven starken Rückgang in den Gesamttonnagen waren die Reduzierungen für die Tetracykline, Sulfonamide, Makrolide und Penicilline besonders auffallend. In den letzten Jahren kam es bei einzelnen Wirkstoffgruppen zu einer Stabilisierung der Verbrauchszahlen. Insgesamt ist eine Verschiebung hin zu solchen Wirkstoffklassen zu verzeichnen, bei denen die Einzeldosierungen pro Tier im Niedrigbereich liegen.

Tab. 1: Vergleich der Antibiotika-Abgabemengen bezogen auf die Wirkstoffklassen 2011 bis 2018

| Wirkstoffklasse | Abgegebene Menge [t] 2011 | Abgegebene Menge [t] 2012 | Abgegebene Menge [t] 2013 | Abgegebene Menge [t] 2014 | Abgegebene Menge [t] 2015 | Abgegebene Menge [t] 2016 | Abgegebene Menge [t] 2017 | Abgegebene Menge [t] 2018 | Differenz [t] 2011-2018 |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Aminoglykoside | 47 | 40 | 39 | 38 | 25 | 26 | 29 | 30 | - 17 |
| Cephalosp., 1. Gen. | 2,0 | 2,1 | 2,1 | 2,1 | 1,9 | 2,0 | 2,0 | 2,1 | + 0,1 |
| Cephalosp., 3. Gen. | 2,1 | 2,3 | 2,3 | 2,3 | 2,3 | 2,3 | 2,3 | 1,3 | - 0,8 |
| Cephalosp., 4. Gen. | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,3 | 1,1 | 1,1 | 0,5 | - 0,9 |
| Fenicole | 6,1 | 5,7 | 5,2 | 5,3 | 5,0 | 5,1 | 5,6 | 6,0 | - 0,1 |
| Fluorchinolone | 8,2 | 10,4 | 12,1 | 12,3 | 10,6 | 9,3 | 9,9 | 7,7 | - 0,5 |
| Folsäureantagonisten | 30 | 26 | 24 | 19 | 10 | 9,8 | 7,8 | 8,0 | - 22 |
| Fusidinsäure* | | | | | | | | | |
| Ionophore* | | | | | | | | | |
| Lincosamide | 17 | 15 | 17 | 15 | 11 | 9,9 | 11 | 9,9 | - 7,1 |
| Makrolide | 173 | 145 | 126 | 109 | 52 | 55 | 55 | 59 | - 114 |
| Nitrofurane* | | | | | | | | | |
| Nitroimidazole* | | | | | | | | | |
| Penicilline | 528 | 501 | 473 | 450 | 299 | 279 | 269 | 271 | - 257 |
| Pleuromutiline | 14 | 18 | 15 | 13 | 11 | 9,9 | 13 | 8,2 | - 5,8 |
| Polypeptidantibiotika | 127 | 123 | 125 | 107 | 82 | 69 | 74 | 74 | - 53 |
| Sulfonamide | 185 | 162 | 152 | 121 | 73 | 69 | 62 | 63 | - 122 |
| Tetrazykline | 564 | 566 | 454 | 342 | 221 | 193 | 188 | 178 | - 386 |
| Summe | 1.706 | 1.619 | 1.452 | 1.238 | 805 | 742 | 733 | 722 | - 984 |

Scheinbare Ungenauigkeiten oder Abweichungen bei den Mengenangaben sind durch Rundungseffekte bedingt.

*Wahrung des Geschäfts- und Betriebsgeheimnisses, Daten dürfen nicht veröffentlicht werden, da es i. d. R. nur einen Zulassungsinhaber gibt (nach § 6 IFG und § 9 Abs. 1 (3) UFG)

© BVL 2019

Im Ergebnis des **Antibiotika-Monitorings** in Thüringen wurde gezeigt, dass die Belastung in Wirtschaftsdüngern hauptsächlich durch Tetracycline, Sulfonamide und *Lincomycin* gegeben ist, wobei Schweinegülle die im Mittel höchsten Konzentrationen aufwies (Tolzin-Banasch et al., 2015). Die weitere Verbreitung von Resistenzgenen in der Umwelt und der zumindest bei Jungpflanzen nachgewiesene Transfer von Antibiotika aus dem Bodenmilieu via Wurzel in die oberirdischen Pflanzenteile oder ggf. direkt in naheliegende Grundwasserleiter stellen aktuelle Herausforderungen für die Wissenschaft und die Agrarbetriebe dar (Kümmerer, 2004; Boxall et al., 2006; Grote et al., 2007; Schwake-Anduschus, 2009; Gutierrez et al., 2010; Jechalke et al., 2014; Tolzin-Banasch et al., 2015; Carter und Kinney, 2018; UBA, 2019).

Durch die *European Medicines Agency* (EMA) ist im Jahre 2008 für die Zulassung neuer Tierarzneimittel ein umweltrelevanter Schwellenwert nach Gülleausbringung von 0,1 mg/kg Boden festgelegt worden. Insgesamt ist die Problematik wissenschaftlich noch unzureichend bearbeitet.

Analytische Methoden zur Antibiotikabestimmung inkl. ihrer Metaboliten in den verschiedensten Umweltmatrices sind noch nicht harmonisiert bzw. standardisiert und müssen aufgrund der chemischen Eigenschaften der einzelnen Wirkstoffe und -klassen zur exakten Quantifizierung weiter entwickelt werden (Heberer et al., 2004; Carballa et al., 2007; Panzeri et al., 2013; Jindal et al., 2015; Tolzin-Banasch et al., 2015; Boix et al., 2019; Zühlke, 2019).

2. Zielstellung

In dem praxisnahen Projekt sollte eine sichere analytische Methode für die Bestimmung von antibiotischen Substanzen, einschließlich deren Metaboliten und Transformationsprodukten in den verschiedenen Matrices Gülle, Jauche, Gärrest und Festmist erarbeitet und validiert werden, die als **robuste und praktikable Screeningmethode** der Vielfalt der antibiotischen Wirkstoffe und Wirtschaftsdünger- Matrices einschließlich der im Projekt geplanten verfahrenstechnischen Aufwendungen Rechnung trägt. Die Analytik sollte mittels HPLC-MS Kopplung mit vorrausgehender Probenaufbereitung erfolgen. Ein erster Schritt der Methodenentwicklung war dabei die Entwicklung einer geeigneten matrix- unabhängigen HPLC-MS- Methode, die eine möglichst hohe Empfindlichkeit gewährleistet. Des Weiteren musste eine geeignete Probenvorbereitung und matrixangepasste Messmethode entwickelt werden, welche insbesondere die schwierige Probenmatrix berücksichtigt. Es sollten mit Hilfe von gespikten Proben in der realen Matrix (Zuhilfenahme von verfügbaren unbelasteten Proben) entsprechende Probenvorbereitungsmethoden (SPE, GPC usw.) auf ihre Tauglichkeit überprüft werden.

Die innovative Analytik als notwendige Voraussetzung für den Nachweis des Abbaus dieser Substanzen im Rahmen eines neuartigen Verfahrensansatzes mit gezielter agrobiotechnologische Prozessführung zur nachhaltigen Ressourcenverwendung sollte im Labormaßstab vorbereitet und im kleintechnischen Maßstab entwickelt und erprobt werden. Eine erstmalige Abbaubilanzierung antibiotischer Substanzen durch Messung des Inputs und Outputs inklusive der wichtigsten Metaboliten soll mit der entwickelten Messmethodik später möglich werden. Die Ergebnisse der Methodenentwicklung und der internen und externen Qualitätssicherung sollen die Grundlage für einen ersten Normentwurf des entwickelten Verfahrens sein.

Das geplante ökologisch ausgerichtete Projekt sollte dabei für die Entwicklung eines innovativen „low tech“- und „low cost“- Verfahrens zum Abbau von Antibiotika in Wirtschaftsdünger und seine Überführung in den großtechnischen Pilotmaßstab dienen, und eine adäquate reproduzierbare und sichere Analytik bereitstellen. Es sollten verfahrenstechnische und in der Praxis umsetzbare Ansätze für agrobiotechnologische Behandlungsstufen identifiziert werden, die die Konzentrationen von Antibiotika und ihrer Metaboliten signifikant reduzieren können. Die Basis für eine erstmalige technologisch und ökonomisch umsetzbare Technologie für den Einsatz in landwirtschaftlichen Unternehmen zur Reduzierung antibiotisch wirksamer Substanzen sollte gelegt werden. Damit sollte erstmals eine praktisch anwendbare Lösung für die in immer größeren Konzentrationen in der Umwelt auffindbaren antibiotisch wirkenden Substanzen entwickelt werden.

Wissenschaftliche Grundlagenerkenntnisse aus der Bodenbiologie und -sanierung, der Biotechnologie, Siedlungswasser- und Abfallwirtschaft sollten in praktikabler Weise angepasst und weiterentwickelt werden, damit die Agrarbetriebe zukünftig in Eigenregie mit wirtschaftlich vertretbarem Aufwand die betriebseigenen Dünger in hygienisch und toxikologisch sicherer und geeigneter Weise behandeln, veredeln und schließlich innerhalb des geschlossenen betrieblichen Kreislaufes ausbringen können.

Das Projekt sollte einen innovativen Beitrag zum umfassenden Grundwasser- und Bodenschutz leisten. Über die umfängliche Schutzwirkung auf den Kreislauf Boden/Pflanze/Grundwasser ist damit auch die positive Wirkung auf Tierwohl und -gesundheit direkt und indirekt gegeben.

3. Material und Methoden

3.1 Recherche

Ausgangspunkt des umfangreichen Forschungsprojekts war eine intensive Recherche zu den in der landwirtschaftlichen Praxis real eingesetzten Antibiotika. Sowohl aktuelle Veröffentlichungen seitens des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), des Umweltbundesamtes (UBA), weiterer Bundesbehörden bzw. -institutionen, dem Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz (TLV), als auch (internationale) Fachpublikationen zu analytischen Methoden, dem tierspezifischen Einsatz der Veterinärantibiotika, ihres Verhaltens in den verschiedenen Umweltkompartimenten einschließlich ihrer Toxikologie wurden dabei berücksichtigt. Der Schwerpunkt der Recherchen lag jedoch in einer intensiven anonymen Befragung von praktizierenden Tierärzten und Leitern von tierhaltenden Agrarbetrieben und in vertraulichen persönlichen Gesprächen, um letztendlich ein möglichst reales und zeitkonformes Bild der Anwendungspraxis von Veterinärantibiotika in Thüringen zu erhalten.

3.2 Auswahl der Antibiotika

Mit der sehr umfangreichen Recherche zum Einsatz der Veterinärantibiotika in der Praxis mit dem Schwerpunkt Thüringen wurde eine wichtige Basis für die anschließende gezielte Auswahl der Einzelsubstanzen gelegt. In besonderer Weise hilfreich und unterstützend war das seitens der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft (jetzt TLLLR) in den Jahren 2010 - 2013 erfolgte „Antibiotikamonitoring“ und die enge kooperative Zusammenarbeit und Abstimmung im Rahmen der Projekttreffen und darüber hinaus. Für die Entwicklung der analytischen Methodik wurden 38 verschiedene Einzelsubstanzen eingesetzt. Aus allen wichtigen Antibiotikaklassen wurde im Rahmen der Durchführung der Abbauversuche und weiteren Verfahrensentwicklung mindestens ein praxisrelevanter Wirkstoff ausgewählt.

3.3 Entwicklung geeigneter LC-MS – Messmethodik

Voraussetzung für die Entwicklung einer Methode zur Untersuchung von Antibiotikarückständen in Wirtschaftsdüngern war die Beschaffung von geeigneten Referenzstandards. Viele Substanzen waren nur in Form von Mischstandards (vgl. *Tylosin*, *Colistin*, *Gentamicin*) verfügbar. Im Weiteren erfolgte die Beprobung geeigneter LC-Säulen, um die angestrebte Varianz an Substanzen selektiv und sensitiv trennen zu können. Darauf aufbauend wurde eine Datenbank mit optimierten Parametern zur Bestimmung der Analyten erstellt. Die Fülle verschiedener Substanzklassen machte es weiterhin erforderlich, eine geeignete Extraktions- und Analysemethodik zu entwickeln, welche basierend auf einem umfangreichen Literaturstudium in der Lage ist, alle Besonderheiten der verschiedenen Antibiotika und Matrices umfassend abzubilden. Eine weitere Herausforderung bestand in der geringen Empfindlichkeit des zum Zeitpunkt der Untersuchung zur Verfügung stehenden Messgerätes (Sciex API 2000 Massendetektor). Die zu entwickelnde Methode wurde aus diesem Grund um einen Aufkonzentrierungsschritt erweitert.

3.4 Agrobiotechnologische Verfahrensentwicklung und Abbaueversuche

Vorversuche

In mehrmonatigen Vorversuchen in 10l-Behältern wurden die verschiedenen Wirtschaftsdünger Gärrest, Rindergülle, Schweinegülle und Hühner trockenkot (HTK) mit Stroh (gehäckselt) versetzt und begleitet durch ein- bis zweimaliges Aufschütteln innerhalb von 10 Tagen aeroben Umsetzungsprozessen unterzogen.

Parallel wurden Varianten mit Gärrest, Stroh und Rindenkompost sowie „klassischem“ Rindermist geführt. Dabei wurde eine Materialfeuchte von 50 – 60% eingestellt und für die Gesamtdauer des Prozesses aufrechterhalten, ggf. mit Wasser nachgefeuchtet. Die Materialien stammten aus Betrieben bzw. von Tierhaltern, die keine Antibiotika einsetzten.

Migrationstest

Die Wirtschaftsdüngeransätze *Rindermist*, *Gärrest mit Stroh* und *HTK mit Stroh* wurden für erste Untersuchungen zum Migrations- und Abbauverhalten der ausgewählten Antibiotika (vgl. Tab. 3.4) eingesetzt. Hierzu wurde das jeweilige Material gefriergetrocknet, gemahlen und mit der Dotierlösung versetzt, so dass der Ansatz auf eine Wirkstoff-Konzentration von 1 µg/g TS Substrat eingestellt werden konnte, wobei *Ceftiofur* und *Florfenicol* geringer dosiert waren.

Tab. 3.4: Auswahl der Antibiotikawirkstoffe und Gehalte in Dotierlösung

| Substanz | Konzentration in mg/mL |
|-----------------|------------------------|
| Cefoperazon | 1,0 |
| Ceftiofur | 0,1 |
| Cephalexin | 1,0 |
| Cloxacillin | 1,0 |
| Enrofloxacin | 1,0 |
| Florfenicol | 0,5 |
| Lincomycin | 1,0 |
| Oxytetracyclin | 1,0 |
| Penicillin G | 1,0 |
| Spectinomycin | 1,0 |
| Sulfamethoxazol | 1,0 |
| Trimethoprim | 1,0 |

Die dotierten Substrate wurden in Teebeutel gefüllt und mittels eines umschließenden Kunststoffnetzes in 10 l-Behälter (gefüllt mit jeweils 6 l undotierten Materials) bei 50 – 60 % Feuchtegehalt eingebaut (vgl. Abb. 3.4.1). Durch nachfolgende regelmäßige Probenahmen der dotierten Substrate in den „Säckchen“ sowie des umliegenden, teilweise anhaftenden Substrates wurde das Migrations- bzw. Abbauverhalten der dotierten Wirkstoffe ermittelt.



Abbildung 3.4.1: *Präparation der dotierten Substrate („Säckchen“) im Migrationstest*

Abbautests

In mehrmonatiger gezielter Verfahrensführung in 1 l-Flaschen (vgl. Abb. 3.4.2) wurden die dotierten Substrate (inkl. in zusätzlicher [1:10]-Verdünnung der Dotierlösung) durch wöchentlich einmaliges Aufschütteln aeroben Abbautests unterzogen. Mittels folgender kontinuierlicher Probenahmen der verschiedenen Ansätze bzw. Varianten wurde das Abbauverhalten der dotierten Wirkstoffe ermittelt. In der weiteren Darstellung werden die [1:10]-Verdünnungen nicht weiter berücksichtigt, da sie ein nahezu gleiches Abbau- bzw. Eliminationsverhalten wie die höher dotierten Substrate zeigten.



Abbildung 3.4.2: *Dotierte Substrate (Originaldotierung sowie 1:10 Verdünnung) im Abbautest*

Die folgenden Varianten bzw. dotierten Substrate wurden eingesetzt:

(1) Erde/Mutterboden; (2) Kompost; (3) Stroh; (4) Rindergärrest + Stroh (RiGR+Str); (5) HTK + Stroh; (6) Rindergülle + Stroh (RiGü); (7) Schweinegülle + Stroh; aus Migrationstests: (8) Huhn + Stroh; (9) Rindergärrest + Stroh (RiGü+Str); (10) Rindermist (RiMi)

Kleintechnische Versuche

Die kleintechnischen Versuche wurden auf dem Gelände des landwirtschaftlichen Projektpartners durchgeführt und durch Mitarbeiter vor Ort betreut. Die nachfolgenden Versuchsvarianten bzw. -aufbauten wurden dabei getestet:

- (1) Stroh undotiert; (2) Stroh dotiert; (3) Rindermist undotiert; (4) Rindermist dotiert; (5) Schweinegülle + Stroh undotiert; (6) Schweinegülle + Stroh dotiert; (7) HTK + Stroh undotiert; (8) HTK + Stroh dotiert

Die Versuchsansätze (3) und (4) erfolgten in „klassischen“ Miststapelhaufen, wobei das undotierte bzw. dotierte Substrat in „Säckchen“ (analog Migrationstest) eingebaut wurde (Abb. 3.4.3). Die weiteren Varianten wurden in 15l- Behältern als undotierte bzw. dotierte Matrices, parallel geführt, eingesetzt. Dabei hatten der HTK und die Schweinegülle eine antibiotische Vorbelastung, das Stroh und die Gülle waren rückstandsfrei.



Abbildung 3.4.3: „Klassischer“ Miststapelhaufen

Die eingesetzten antibiotischen Wirkstoffe *Cefoperazon*, *Ceftiofur*, *Cephalexin*, *Cloxacillin*, *Enrofloxacin*, *Florfenicol*, *Lincomycin*, *Oxytetracyclin*, *Penicillin G*, *Spectinomycin*, *Sulfamethoxazol* und *Trimethoprim* wurden in der Dotierlösung jeweils in einer Konzentration von 100 µg/mL eingesetzt.

Parallel zu den Labor- und kleintechnischen Versuchen wurde die Lagerung von Wirkstoff- belastetem Wirtschaftsdünger (Schweinegülle, HTK) und ihr Einfluss auf den Gehalt der Antibiotika über einen Zeitraum von 1,5 Jahren untersucht. In den Originalsubstraten waren die Wirkstoffe *Amoxicillin*, *Enrofloxacin*, *Penicillin G*, *Sulfaguanidin* und *Tetracyclin* nachgewiesen worden.

3.5 Mikrobiologische Bewertung und Entwicklung einer Prüfroutine

Ein wesentlicher Effekt der Ausbringung von antimikrobiellen Wirkstoffen im Wirtschaftsdünger ist die Veränderung der mikrobiellen Bodenflora. Dabei sind sowohl unmittelbare Effekte auf die Organismendichte und Zusammensetzung, auch als hygienische Problematik, sowie die Ausbildung von Resistenzen gegen die Wirkstoffe zu erwarten und auch belegt (Martinez, 2017). Die unmittelbaren Auswirkungen sind je nach Ausbringung lokal und temporär beschränkt. Die Resistenzentwicklung hat ein langfristiges Potential und kann via Gentransfer vertikal und horizontal weitergegeben werden.

Proben von Wirtschaftsdünger in Form von Gülle, Kot sowie Gärresten aus der Biogasgewinnung standen als Ausgangsmaterial zur Verfügung. Sie wurden für die mikrobiologische Analyse aufgearbeitet. Abhängig von der Konsistenz (Feststoffanteil, faserhaltiges Material) wurden Verfahren optimiert, um die enthaltenen Mikroorganismen zur nachfolgenden Kultivierung in Suspension zu bringen. Für die Ablösung von Oberflächen, die Auflösung von Aggregationen und Verteilung in der Flüssigphase erwies sich die variable Verdünnung und anschließende mechanische Homogenisierung mittels Ultraturrax, stufenweise 8000, 8500 und 13500 rpm, je 1 min, als geeignet. Da ein hoher Faseranteil in Stroh-Mischungen dafür hinderlich war, wurde dort eine Abfolge von Mischungen auf Vortex (1 min) und Schüttler (über 30 min) angewandt. Die erhaltenen Suspensionen wurden, ggf. mit entsprechenden Dotierungen, auf festen Agar-Nährmedien ausgestrichen und kultiviert.

Mit den verwendeten Verfahren wurde eine semi-quantitative Bestimmung kultivierbarer Bakterien und Schimmelpilze durchgeführt. Nach Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl wurden als hygienerelevante Gruppen Enterobacteriaceae, darunter speziell *Escherichia coli*, Enterokokken, Staphylokokken, anaerob wachsende Bakterien wie Clostridien und Milchsäurebakterien, sowie Schimmelpilze isoliert.

Dabei kamen Universalmedien (CaSo-, Columbia-Blut-Agar) und Selektivmedien (Rapid-E. coli-, Lactose-TTC-, Slanetz-Bartley-Agar) zur Anzucht ausgewählter Bakteriengruppen zum Einsatz. Für Pilze wurden Malzextrakt-, Dichloran-Glycerol- und Potato-Dextrose-Agar verwendet. Zur Abschätzung der Anteile resistenter Bakterien wurden Kolonien isoliert und mittels Agar-Diffusionstest gegen die für die Gruppen geeigneten Antibiotika geprüft.

3.6 Wirtschaftlichkeitsabschätzung

Im Rahmen einer Wirtschaftlichkeitsabschätzung und ausgehend von den Analysen zum Abbau von Antibiotika unter für die Praxis geeigneten Bedingungen wurden verschiedene methodische Ansätze mit Blick auf die Kosten für einen Agrarbetrieb, auch als Basis für weitere Überlegungen und Anpassungen bzw. Optimierungen relevanter verfahrenstechnischer Ansätze erstmals bewertet und auf ihre grundsätzliche Machbarkeit hin überprüft.

3.7 Internationaler Workshop

Am 10. und 11. Januar 2019 wurde in Weimar ein internationaler Workshop zur Antibiotikaanalytik und -bewertung in den Räumen der MFPA Weimar durchgeführt. Zahlreiche Forschergruppen im In- und Ausland wurden für den Workshop kontaktiert und eingeladen.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Recherchen zum Antibiotika-Einsatz in der Praxis

In den nachfolgenden Tabellen sind die Ergebnisse aus den persönlichen Befragungen und Recherchen zum Einsatz von Veterinärantibiotika in der Praxis zusammengefasst dargestellt. Dabei wurde die Anwendung von Antibiotika bei Schwein und Geflügel gemeinsam betrachtet, da es auffällige Parallelen gibt.

Tab. 4.1.1: Antibiotika-Einsatz bei Schwein (S) und Geflügel (G) nach Recherche

| Wirkstoffgruppe | Wirkstoff | Einsatz |
|---|--------------------------------------|-----------------|
| Tetracycline | Oxytetracyclin | G + S |
| | Doxycyclin | G + S |
| | Chlortetracyclin | G + S |
| | Tetracyclin | G + S |
| Sulfonamide | Trimethoprim + Sulfamethoxazol | <i>Geflügel</i> |
| | Sulfachlorpyrazin + Sulfaclozin | <i>Geflügel</i> |
| | Sulfaquinoxalin | <i>Geflügel</i> |
| Chinolone | Enrofloxacin | G + S |
| | Danofloxacin | <i>Schwein</i> |
| | Marbofloxacin | <i>Schwein</i> |
| Makrolide, Pleuromutiline + Lincosamide | Lincomycin | G + S |
| | Tiamulin | <i>Geflügel</i> |
| | Tildipirosin | <i>Schwein</i> |
| | Tilmicosin | <i>Geflügel</i> |
| | Tulathromycin | <i>Schwein</i> |
| | Tylosin, Tylan, Tylosin A | G + S |
| Penicilline und Cephalosporine | Amoxicillin | G + S |
| | Ampicillin | <i>Geflügel</i> |
| | Benzylpenicillin (Penic. G) -Procain | G + S |
| | Cefquinom | <i>Schwein</i> |
| | Ceftiofur | <i>Schwein</i> |
| Aminoglykoside | Neomycin | G + S |
| | Gentamycin | <i>Schwein</i> |
| | Spectinomycin | G + S |
| Polypeptide | Colistin | G + S |
| Amphenicole | Florfenicol | <i>Schwein</i> |

blau

vereinbarte Substanzen

hellgrün

Monitoring

braun

Kostenbedingt gestrichen

dunkelgrün

in Ergänzung aufgenommene Substanzen

Die sowohl beim Schwein als auch Geflügel häufig eingesetzten Antibiotika gehören nahezu allen Wirkstoffgruppen an (vgl. Tab. 4.1.1). Bevorzugt eingesetzt werden verschiedene Tetracykline, *Lincomycin* und *Tylosin*, β -Lactame (*Amoxicillin*), *Spectinomycin*, *Colistin* und Chinolone (*Marbofloxacin*, *Enrofloxacin*). Ausnahmen bildeten die Sulfonamide mit Schwerpunkt Geflügel und Amphenicole (Schwein).

Tab. 4.1.2: Antibiotika- Einsatz und Einsatzhäufigkeit bei Rind nach Recherche

| Wirkstoffgruppe | Wirkstoff | Einsatzhäufigkeit |
|---------------------------------------|--|-------------------|
| Tetracycline | Oxytetracyclin (-Hydrochlorid) | mittel bis selten |
| | Oxytetracyclin (-Dihydrat) | selten |
| | Tetracyclin | selten |
| Sulfonamide | Trimethoprim + Sulfamethoxazol | selten |
| Chinolone | Enrofloxacin | häufig |
| | Marbofloxacin | mittel bis häufig |
| Makrolide, Pleuromutil. + Lincosamide | Lincomycin | häufig |
| | Tiamulin | |
| | Tilmicosin | |
| | Tulathromycin | |
| | Tylosin | häufig |
| Penicilline und Cephalosporine | Amoxicillin (+ Clavulansäure) | mittel bis selten |
| | Ampicillin (+ Cloxacillin) | häufig |
| | Benzylpenicillin (Penic. G) - <i>Procain</i> | sehr häufig |
| | Cloxacillin (+ Benzylpenicillin) | häufig |
| | Oxacillin | häufig |
| | Cefoperazon | sehr häufig |
| | Cefquinom | sehr häufig |
| | Cefapirin (+ Prednisolon) | mittel bis selten |
| | Cephalothin | selten |
| | Cefalexin (+ Kanamycin) | häufig |
| | Ceftiofur | häufig |
| Aminoglykoside | Gentamicin | |
| | Kanamycin | |
| | Spectinomycin | |
| Polypeptide | Colistin | selten |
| Amphenicole | Florfenicol | sehr häufig |
| blau | vereinbarte Substanzen | |
| hellgrün | Monitoring | |
| braun | Kostenbedingt gestrichen | |
| dunkelgrün | in Ergänzung aufgenommene Substanzen | |

Beim Rind verstärkt eingesetzte Antibiotika umfassen die Wirkstoffklassen Chinolone (*Enrofloxacin*, *Marbofloxacin*), β -Lactame (*Ampicillin*, *Cloxacillin*, *Oxacillin*, *Penicillin G*) einschließlich der Cephalosporine *Cefoperazon*, *Ceftiofur*, *Cefquinom* und *Cefalexin*, das Amphenicol *Florfenicol* sowie die Wirkstoffe *Lincomycin* und *Tylosin* (vgl. Tab. 4.1.2).

Die in Tabelle 3.4 aufgelisteten Wirkstoffe wurden als praxisrelevante Vertreter der wichtigsten Wirkstoffklassen unter den Aspekten ihrer Einsatzrelevanz und Kosten für die Abbauprobe ausgewählt. Die Wirkstoffe *Cefoperazon*, *Ceftiofur*, *Cephalexin*, *Cloxacillin*, *Enrofloxacin*, *Florfenicol*, *Lincomycin*, *Oxytetracyclin*, *Penicillin G*, *Spectinomycin*, *Sulfamethoxazol* und *Trimethoprim* repräsentieren die große Vielfalt der Antibiotikawirkstoffe und wurden in den verwendeten Dotierlösungen eingesetzt.

4.2 Entwicklung und Validierung der Messmethode

Die Zielstellung der Entwicklung einer Screening-Methode, welche sowohl eine qualitative als auch quantitative Aussage über den Gehalt der Probe zulässt und dabei den Einfluss unterschiedlicher Düngermatrizes kompensiert, wurde grundsätzlich erfüllt. Den limitierenden Faktor bei der qualitativen Bestimmung stellt der Umfang der MS-Datenbank sowie die Zugänglichkeit von geeignetem Referenzmaterial dar. Für eine quantitative Aussage ist aufgrund der Komplexität der Matrizes ein Standardadditionsverfahren erforderlich. Im Verlauf der Untersuchungen zum Projekt ABIOTEC und im Zuge der Validierung durch die TLLR konnte gezeigt werden, dass die etablierte Methodik sowohl reproduzierbar als auch leicht handhabbar ist.

4.3 Probenvorbereitung

Zur analytischen Untersuchung wurde jeweils 1 g Trockenmasse der verschiedenen Matrizes vermahlen und extrahiert. Die Behandlung der Proben erfolgte in Doppelbestimmung. Alle Proben wurden mit internem Standard versetzt und nach dem gleichen Verfahren behandelt (vgl. Normentwurf, Anhang 1). Aufgrund der umfangreichen Substanzliste und verschiedenen Kotarten wurde auf das Standardadditionsverfahren verzichtet, da die Kapazität im Hinblick auf Probenvorbereitung und -messung limitiert war. Um einen Abbauprobe demonstrieren zu können, wurde unbelasteter Kot dotiert und anschließend eine Probe zum Zeitpunkt „0“, wie in Punkt 13.1 des Normentwurfes, bestimmt. Die Beprobung erfolgte dann zu festgelegten Zeiten und wurde ebenfalls wie in Punkt 13.1 des Normentwurfes bestimmt. Der prozentuale Abbau der Antibiotika wurde dann im Vergleich zum Zeitpunkt „0“ errechnet.

4.4 Normentwurf

Das Ziel einer Norm besteht in der Standardisierung eines Messverfahrens basierend auf wissenschaftlichen Untersuchungen und Erfahrungen mit einem allgemein gültigen Charakter. Dies stellt einen inhaltlichen Widerspruch zur Methodenentwicklung aufgrund der Fülle von unterschiedlichen Substanzen und komplexen Matrizes dar. Eine einheitliche Normierung ist nur mit Einschränkungen möglich und bedarf Vorkenntnisse im Bereich der pharmazeutischen und analytischen Chemie. Eine Standardisierung lässt sich nur aufgrund einschlägiger praktischer Erfahrungen und wiederholtem Umgang mit den verschiedenen Probenarten und Wirkstoffklassen erzielen. Der in Anhang 1 aufgeführte Normentwurf stellt somit eine Unterstützung für die Herangehensweise sowie potentielle Fehlerquellen bei der analytischen Auswertung von Wirtschaftsdüngerproben dar.

4.5 Vergleichsmessungen zur Methodvalidierung des Screeningverfahrens

Ziel:

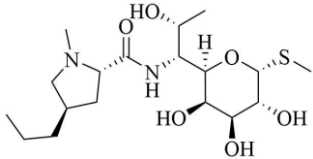
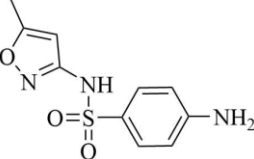
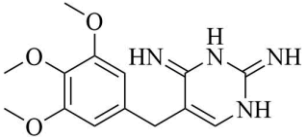
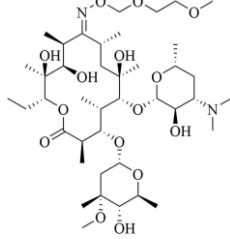
Überprüfung der Methode zum Screening von Antibiotika in verschiedenen Wirtschaftsdüngern.

Vorbereitung:

Tab. 4.5.1: Übersicht der untersuchten Substanzen

| Substanz | Summenformel | CAS | MW [g·mol ⁻¹] | LM | Einwaage [mg] |
|--------------------|---|------------|---------------------------|-----------|---------------|
| Lincomycin HCl | C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₆ S · HCl | 859-18-7 | 443,00 | MeOH + US | 11,34 |
| Sulfamethoxazol | C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S | 723-46-6 | 253,28 | MeOH | 10 |
| Trimethoprim | C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃ | 738-70-5 | 290,32 | MeOH | 10 |
| Roxithromycin (IS) | C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅ | 80214-83-1 | 837,05 | MeOH | 10 |

Tab. 4.5.2: Struktur der untersuchten Substanzen

| Lincomycin | Sulfamethoxazol | Trimethoprim | Roxithromycin |
|--|--|---|--|
|  |  |  |  |
| Lincosamid | Sulfonamid | Diaminopyrimidin | Makrolidantibiotikum |

Proben:

Rindergärrest (**RG**)
 Hühnertrocken (**HTK**)
 Schweinegülle (**SG**)
 gefriergetrocknet, gemahlen, aliquotiert (1 g)

Referenzstandards:

Einwaagen in je 10 mL MeOH lösen,
 ergibt c_{Std} = 1000 µg/mL

Dotierungen:

Tab. 4.5.3: Schematische Übersicht zur Dotierung der Proben zur Vergleichsmessung

| Substanz | HTK | SG | RG |
|-----------------|-------------------------|---------|---------|
| Lincomycin | 0,05 mL | 0,5 mL | 4 mL |
| Sulfamethoxazol | 2,5 mL | 0,25 mL | 5 mL |
| Trimethoprim | 5 mL | 2,5 mL | 0,25 mL |
| MeOH | 2,5 mL | 6,75 mL | 0,75 mL |
| Dotierung | 20 µL der Dotierlösung | | |
| 1. Aufstockung | +20 µL der Dotierlösung | | |
| 2. Aufstockung | +40 µL der Dotierlösung | | |
| 3. Aufstockung | +60 µL der Dotierlösung | | |

Probenextraktion (Vorbereitung API 4000):

- Proben (1 g, gefriergetrocknet, vermahlen) in 50-mL-PP-Zentrifugenröhrchen einwiegen
- Dotierung mit jeweiligem Dotier-Mix
- Zugabe Interner Standard (IS): Roxithromycin (50 µL = 50 µg/g)

- 1. Extraktion: **30 mL** Extraktionslösung (MeOH:Eisessig:Reinstwasser 6:3:1 v/v),
1 h Flachbettschüttler (300 rpm)
- Zentrifugieren (10 min, 5000 rcf), Überstand abnehmen

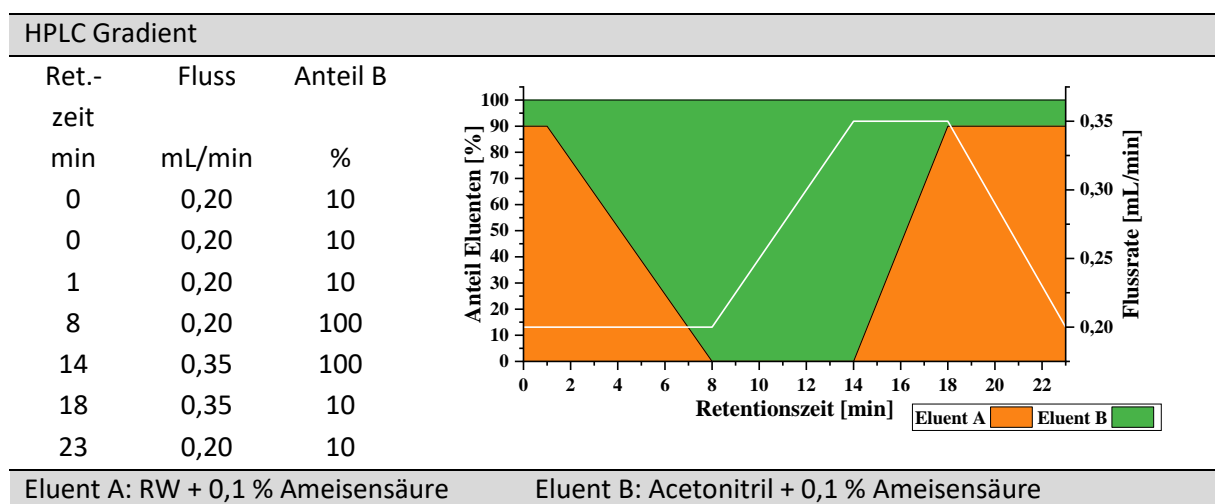
- 2. Extraktion: **20 mL** Extraktionslösung (MeOH:Eisessig:Reinstwasser 6:3:1 v/v),
1 h Flachbettschüttler (300 rpm)
- Zentrifugieren (10 min, 5000 rcf), Überstand abnehmen und Überstände vereinen

- 1 mL der vereinten Überstände in 10 mL Gewindeflasche überführen und zur vollständigen
Trocknung eindampfen
- zähflüssiger, viskoser Rückstand in 10 mL Starteluenten-Mix (RW:ACN 9:1 v/v + 0,1% Ameisensäure)
- Ultraschall (15 min) für vollständige Resuspendierung
- 1 mL der Suspension in Mikroreaktionsgefäß überführen und zentrifugieren
(10 min, 20000 rcf)
- Überstand abnehmen (bei Bedarf erneut zentrifugieren) in 1,5 mL Gewindevial überführen

HPLC-MS:

Trennsäule: Kinetex 1.7 µm XB-C18 100 Å, LC Column 100 x 2.1 mm (00D-4498-AN)
Vorsäule: SecurityGuard ULTRA Cartridges UHPLC C18 2.1mm (AJ0-8782)
SecurityGuard ULTRA Holder, for UHPLC Columns (AJ0-9000)
In-Line Filter: Agilent Filter assembly, in-line, 2.1 mm, 0.2 µm, max 600 bar (5067-1551)
Replacement Frit, 2.1 mm, 0.2 µm (5067-1555)
HPLC: Thermo Fisher Scientific UltiMate 3000
MS: AB Sciex API 4000 LC MS/MS
Software: AB Sciex Analyst 1.6.3
Injektionsvol.: 10 µL

Tab. 4.5.4: Schematische Darstellung des HPLC-Gradientenprogramms



Druck bei Ausgangsbedingungen (A/B 90:10; 0,2 mL/min Fluss): ca. **380 bar**

MRM-Übergänge

Tuning-Lösung: RW 50 %, AcN 50 %, Ameisensäure 0,1 % (v/v), 1 mM Ammoniumacetat
Konzentration: 1 µg/mL

Tab. 4.5.5: Massenübergänge und Retentionszeiten der untersuchten Substanzen

| Substanz | MRM Übergänge (m/z) | RT in Lösung (min) |
|-------------------------|---------------------|--------------------|
| <i>Lincomycin</i> | 407 → 126 | 2,12 |
| | 407 → 359 | |
| <i>Sulfamethoxazol</i> | 254 → 156 | 9,10 |
| | 254 → 92 | |
| <i>Trimethoprim</i> | 291 → 230 | 3,26 |
| | 291 → 261 | |
| <i>IS Roxithromycin</i> | 837 → 679 | 9,85 |
| | 837 → 158 | |

Auswertung nach Standardadditionsanalyse (DIN 38402 – Teil 51, Abschnitt 7.7)

Die Bestimmung der Konzentration erfolgte durch Aufstockung mit Standardlösungen; Dotierung und Aufstockung nach obigem Schema. Die Messungen erfolgten je Aufstockung in Dreifachbestimmung. Aus den Quotienten der Peakflächen von Analyten und internem Standard wurde anhand der Mittelwerte durch Regression die Konzentration ermittelt.

Bestimmung der Wiederfindungsrate $WFR = \frac{c_{ist}}{c_{soll}} \cdot 100$.

Tab. 4.5.6: Ergebnisse der Vergleichsmessung;
Übersicht über errechnete Konzentrationen und Wiederfindungsraten

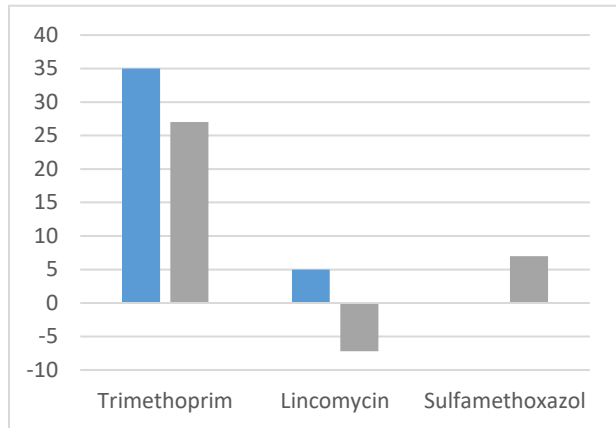
| Hühnertrockenkot | | | | | Messung TLLLR | |
|------------------|-------------------|------------------|------------------|-------|------------------|-------|
| | c_{soll} [µg/g] | c_{ist} [µg/g] | Std.-Abw. [µg/g] | WFR % | c_{ist} [µg/g] | WFR % |
| Trimethoprim | 10 | 13,5 | 1,80 | 135 | 12,7 | 127 |
| Lincomycin | 0,1 | 0,105 | 0,013 | 105 | 0,093 | 92,8 |
| Sulfamethoxazol | 5 | 5,02 | 0,67 | 100 | 5,37 | 107 |

| Schweinegülle | | | | | Messung TLLLR | |
|-----------------|-------------------|------------------|------------------|-------|------------------|-------|
| | c_{soll} [µg/g] | c_{ist} [µg/g] | Std.-Abw. [µg/g] | WFR % | c_{ist} [µg/g] | WFR % |
| Trimethoprim | 5 | 6,95 | 0,85 | 139 | 3,66 | 73,3 |
| Lincomycin | 1 | 1,11 | 0,096 | 111 | 0,96 | 95,7 |
| Sulfamethoxazol | 0,5 | 0,561 | 0,059 | 112 | 0,38 | 75,9 |

| Rindergärrest | | | | | Messung TLLLR | |
|-----------------|-------------------|------------------|------------------|-------|------------------|-------|
| | c_{soll} [µg/g] | c_{ist} [µg/g] | Std.-Abw. [µg/g] | WFR % | c_{ist} [µg/g] | WFR % |
| Trimethoprim | 0,5 | 0,545 | 0,061 | 109 | 0,58 | 116 |
| Lincomycin | 8 | 14,4 | 2,4 | 180 | 9,85 | 123 |
| Sulfamethoxazol | 10 | 8,54 | 0,85 | 85,4 | 12,3 | 123 |

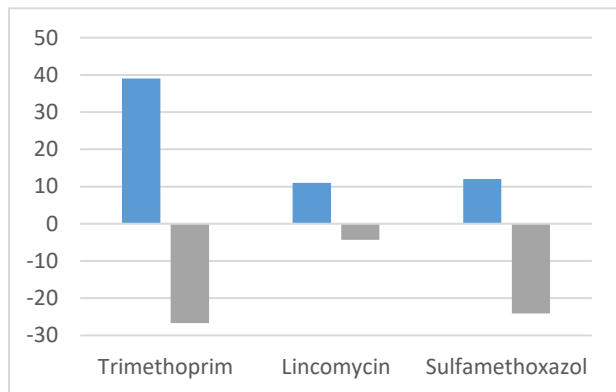
Hühnertrockenkot

Die vergleichende Untersuchung in Zusammenarbeit mit dem *Thüringer Landesamt für Landwirtschaft und Ländlichen Raum (TLLLR)* mit dem Ziel, die etablierte Methode auf ihre Robustheit und Reproduzierbarkeit zu überprüfen, zeigt im Allgemeinen ein homogenes Analyseergebnis. Die untersuchten Proben von Hühnertrockenkot und Rindergärresten zeigen bezüglich ihrer Wiederfindungsraten ein vergleichbares Bild. In Schweinegülle hingegen weisen die drei untersuchten Substanzen im Hinblick auf Über- bzw. Minderbefunde eine deutliche Varianz auf, welche sich auf die Problematik der Homogenität der Schweinegülle-Matrix zurückführen lässt.



Schweinegülle

Die gemeinsame Auswertung der Analysen beider Institute belegte die Wiederfindungsraten durch ein hohes Bestimmtheitsmaß ($r^2 \geq 0,995$) der durch lineare Regression ermittelten Dotierungen der Proben. Trotz der niedrigen Dotierungskonzentrationen und geringen Aufstockungsniveaus lieferten alle Mehrfachbestimmungen ein wiederholbares Ergebnis, welches die eingestellten Konzentrationen mit hoher Genauigkeit abbildete.



In Verbindung mit niedrigen Vergleichsstandardabweichungen lässt dies den Schluss zu, dass die Extraktionsmethode auch ohne vorherige Kenntnisse im Umgang mit komplexen Düngermatrizes eine robuste Möglichkeit zur Probenaufbereitung bietet. Weiterhin bietet das entwickelte Messverfahren eine reproduzierbare und sensitive Methodik, die in der Lage ist Verluste im Analysenprozess zu reduzieren und Matrixeffekte zu eliminieren, was wiederum die Zuverlässigkeit der Untersuchungen bestätigt.

Rindergärrest

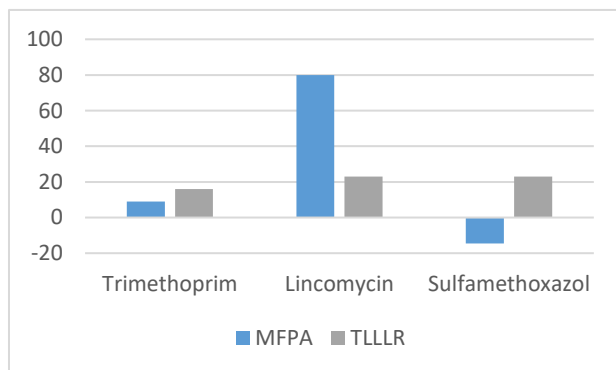


Abbildung 4.5.1:
Darstellung der prozentualen Über- bzw. Minderbefunde beider Versuchsteilnehmer im Vergleich

4.6 Laborversuche zum Abbau von Antibiotika

4.6.1 Vorversuche

Die mehrmonatigen Vorversuche konnten eine aerobe Umsetzung des jeweiligen Substratmaterials sicherstellen, wobei eine Materialfeuchte von 50 – 60% gehalten wurde. Dabei konnte sich teilweise eine auffällige Pilzpopulation etablieren.

4.6.2 Migrationstest

Die Abbildungen 4.6.2.1 – 4.6.2.7 und im Anhang 2 („Migrationstest“) zeigen das Abbauverhalten der Wirkstoffe im dotierten Substrat im Vergleich zu den an den Probensäckchen unmittelbar anhaftenden bzw. anliegenden Materialproben, in die Anteile antibiotischer Stoffe „migriert“ sind.

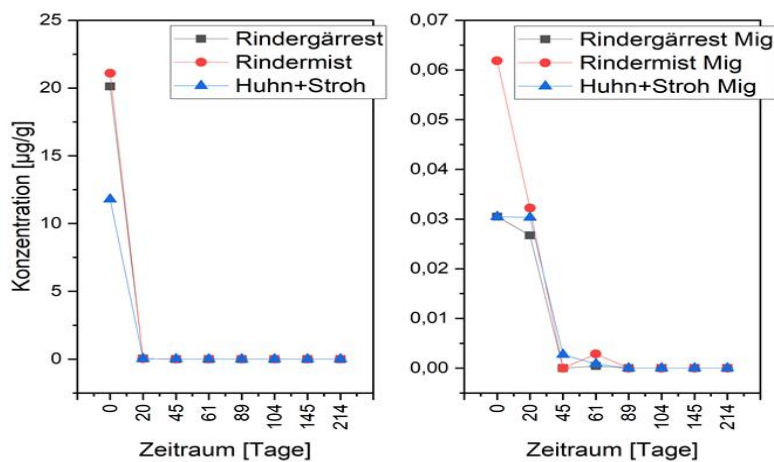


Abbildung 4.6.2.1: *Abbauverhalten von Ceftiofur im dotierten Substrat (linkes Feld) und in unmittelbar umliegendem Substrat (rechtes Feld), in [TM]*

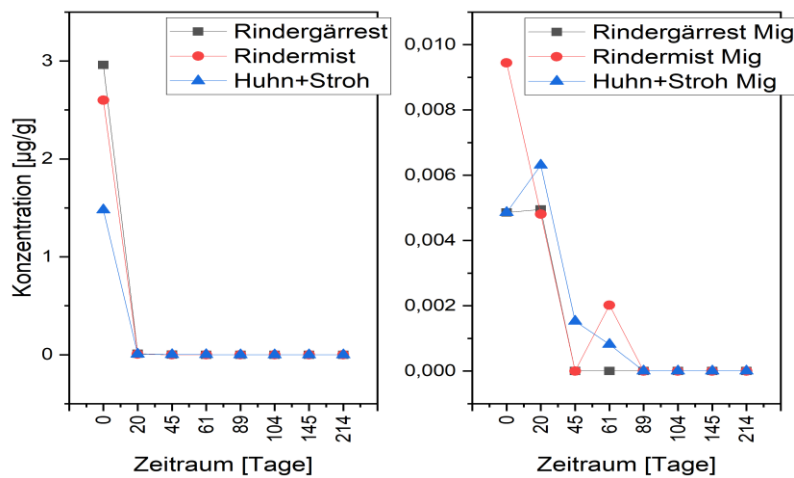


Abbildung 4.6.2.2: *Abbauverhalten von Cloxacillin im dotierten Substrat (linkes Feld) und im unmittelbar umliegenden Substrat (rechtes Feld), in [TM]*

Während die meisten Wirkstoffe, insbesondere die β -Lactame sehr schnell eliminiert wurden (teilweise in 2 – 3 Wochen), gab es beim *Trimethoprim* und *Enrofloxacin* zeitliche Verzögerungen, aber auch auffällige Unterschiede zwischen den Substraten. Beim Rindermist waren die Abbautrends am auffälligsten. Auch beim *Florfenicol*, *Lincomycin* und *Oxytetracyclin* brauchte es 45 Tage, um eine merkliche Wirkstoffreduzierung festzustellen. Einzelne späte Peaks, z.B. beim *Trimethoprim*, können mit „Nesterbildung“ im Substrat aufgrund nicht absolut gleichmäßiger Dotierung der sehr komplexen Substrate oder ggf. Restrukturierungen der zuvor lediglich matrixgebundenen antibiotischen Wirkstoffe zusammenhängen.

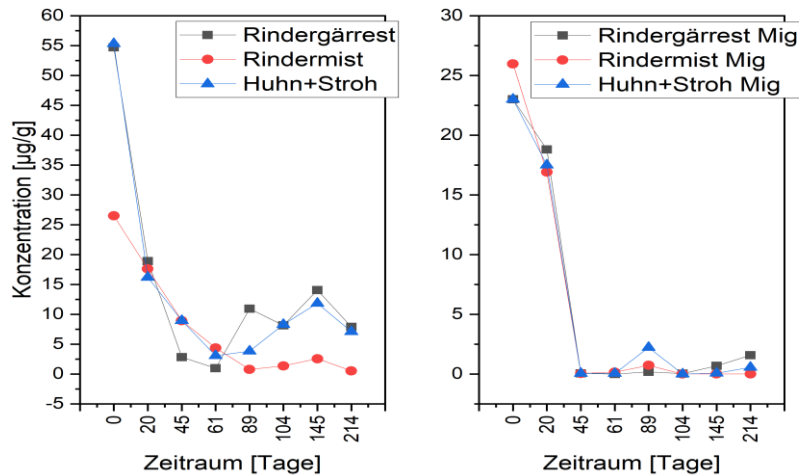


Abbildung 4.6.2.3: *Abbauverhalten von Enrofloxacin im dotierten Substrat (linkes Feld) und im unmittelbar umliegenden Substrat (rechtes Feld), in [TM]*

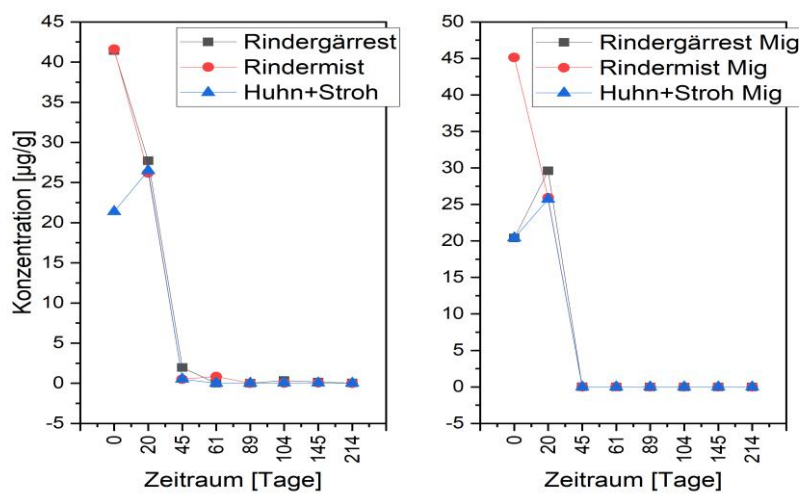


Abbildung 4.6.2.4: *Abbauverhalten von Florfenicol im dotierten Substrat (linkes Feld) und im unmittelbar umliegenden Substrat (rechtes Feld), in [TM]*

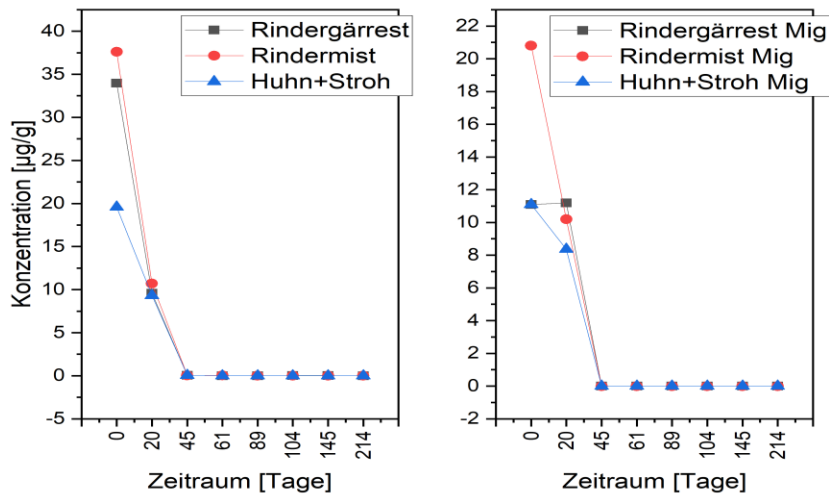


Abbildung 4.6.2.5: *Abbauverhalten von Lincomycin im dotierten Substrat (linkes Feld) und im unmittelbar umliegenden Substrat (rechtes Feld), in [TM]*

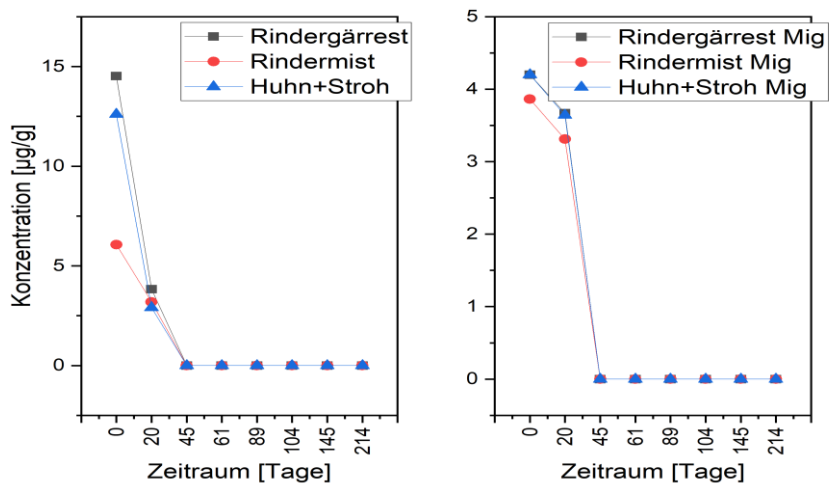


Abbildung 4.6.2.6: *Abbauverhalten von Oxytetracyclin im dotierten Substrat (linkes Feld) und im unmittelbar umliegenden Substrat (rechtes Feld), in [TM]*

Für *Lincomycin*, *Florfenicol* und *Oxytetracyclin* war das Abbauverhalten auffallend ähnlich. Das *Enrofloxacin* erwies sich als insgesamt schwerer abbaubar. Beim *Penicillin G* traten in den ersten Tagen die Transformationsprodukte *Amoxicillin* und *Ampicillin*, beim *Cloxacillin* das *Dicloxacillin* sowie beim *Enrofloxacin* das Transformationsprodukt *Ciprofloxacin* und bei *Lincosamin* das *Clindamycin* auf, die ihrerseits dann auch abgebaut wurden. Die wirkstoffbelasteten „Migrationsproben“ weisen auf die Wasserlöslichkeit und damit Matrixbeweglichkeit der Substanzen hin.

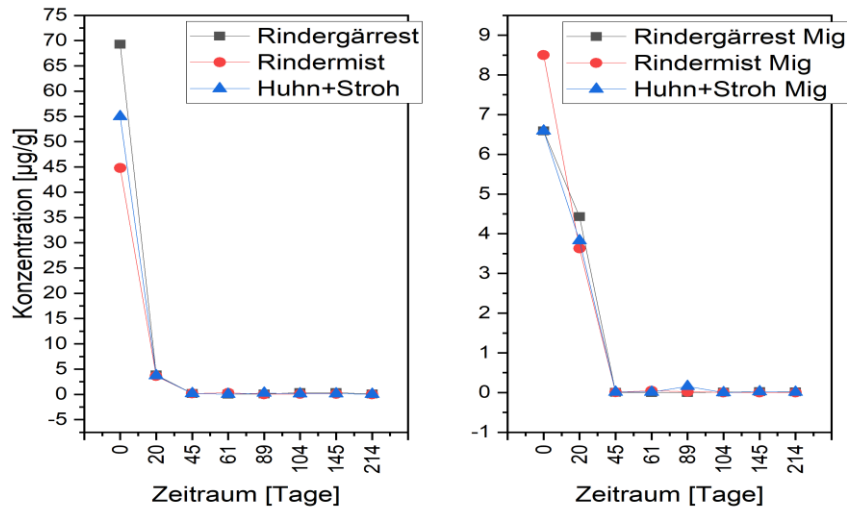


Abbildung 4.6.2.7: *Abbauverhalten von Sulfamethoxazol im dotierten Substrat (linkes Feld) und im unmittelbar umliegenden Substrat (rechtes Feld), in [TM]*

4.6.3 Abbautests

Die laborseitigen Abbautests in Flaschen sollten gezielt eine größere Vielfalt an Substraten im Vergleich zu Erde/Boden, Kompost und reinem Stroh berücksichtigen, um damit einen sicheren Praxisbezug zu realisieren.

Substratvarianten: (1) Erde/Mutterboden; (2) Kompost; (3) Stroh; (4) Rindergärrest + Stroh (RiGR+Str); (5) HTK + Stroh; (6) Rindergülle + Stroh (RiGü); (7) Schweinegülle + Stroh; aus Migrationstests: (8) Huhn + Stroh; (9) Rindergärrest + Stroh (RiGü+Str); (10) Rindermist (RiMi).

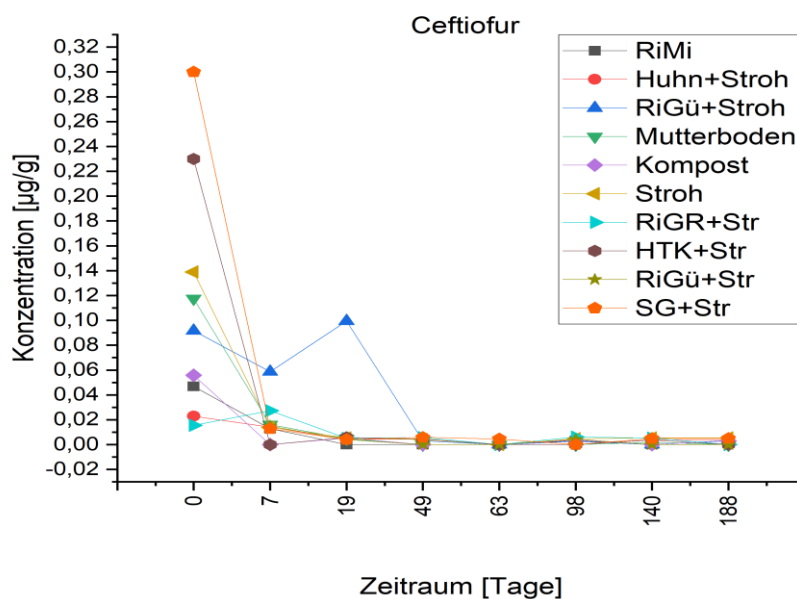


Abbildung 4.6.3.1: *Abbauverhalten von Ceftiofur in dotierten Substraten [TM]*

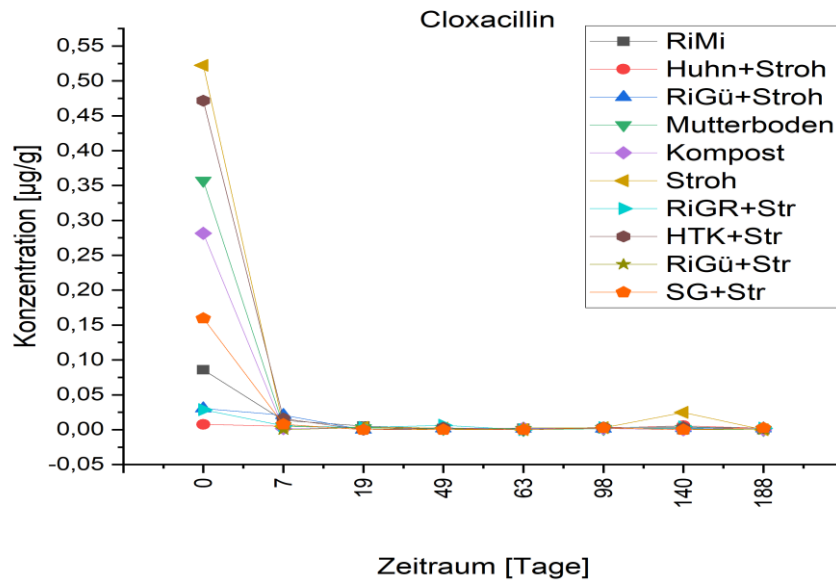


Abbildung 4.6.3.2: *Abbauverhalten von Cloxacillin in dotierten Substraten [TM]*

Die einzelnen Wirkstoffe zeigten im Vergleich ein sehr ähnliches Abbauverhalten wie schon in den Migrationstests. Die β -Lactame wurden bereits nach wenigen Tagen, andere Wirkstoffe wie *Enrofloxacin*, *Florfenicol* und *Lincomycin* deutlich zeitverzögert eliminiert.

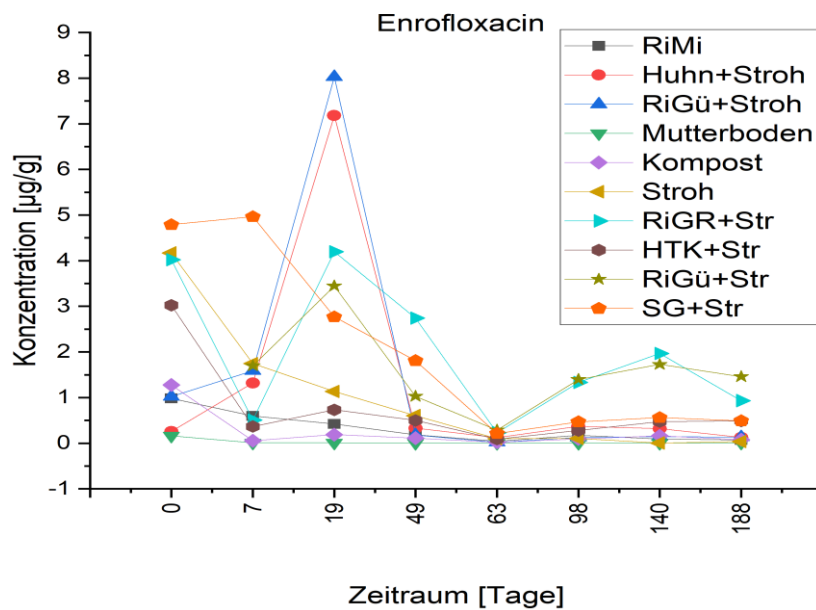


Abbildung 4.6.3.3: *Abbauverhalten von Enrofloxacin in dotierten Substraten [TM]*

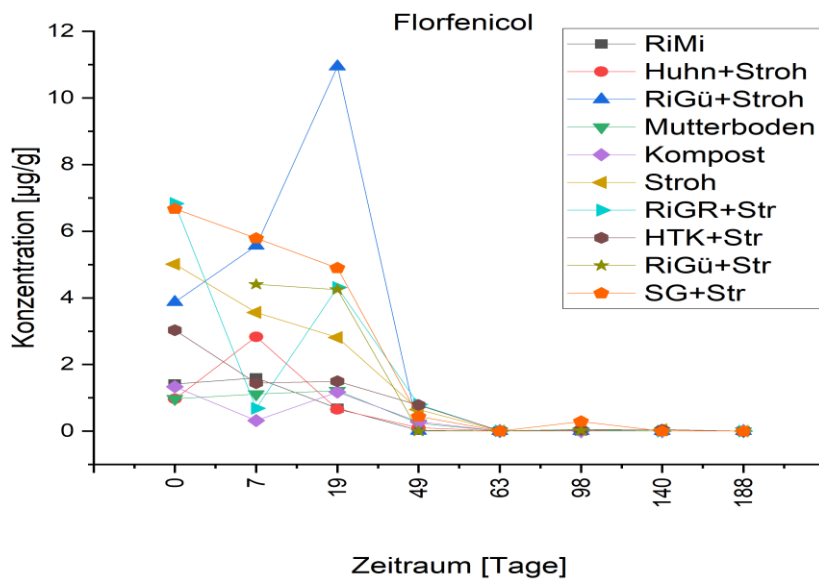


Abbildung 4.6.3.4: *Abbauverhalten von Florfenicol in dotierten Substraten [TM]*

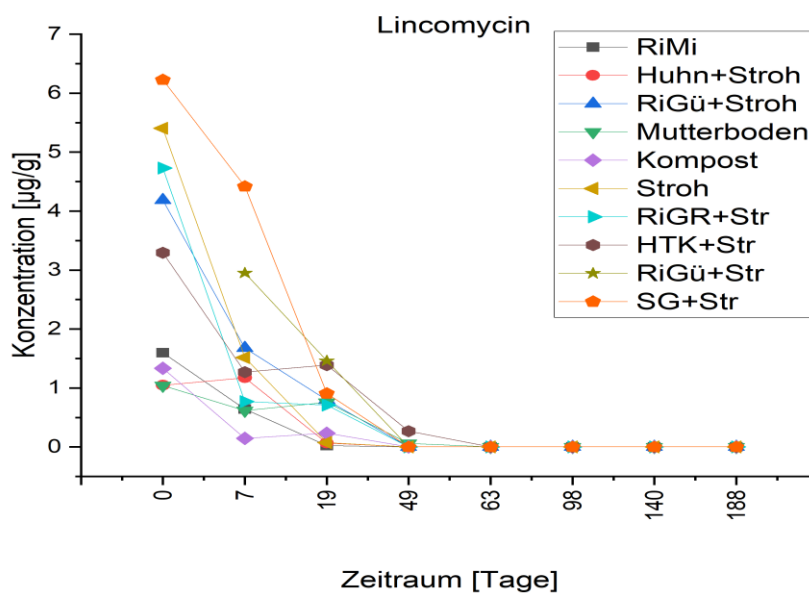


Abbildung 4.6.3.5: *Abbauverhalten von Lincomycin in dotierten Substraten [TM]*

Das Abbauverhalten der Wirkstoffe war auch hinsichtlich der Substratmatrixen, insbesondere in den ersten Tagen und/oder Wochen, sehr verschieden. Dies zeigte sich bei *Cloxacillin*, *Lincomycin* und *Sulfamethoxazol* deutlich. Die gemessenen Startkonzentrationen weisen auf starke Wechselwirkungen der Wirkstoffe mit dem jeweiligen Substrat inklusive erster, sehr früher Transformations- und Abbautendenzen hin.

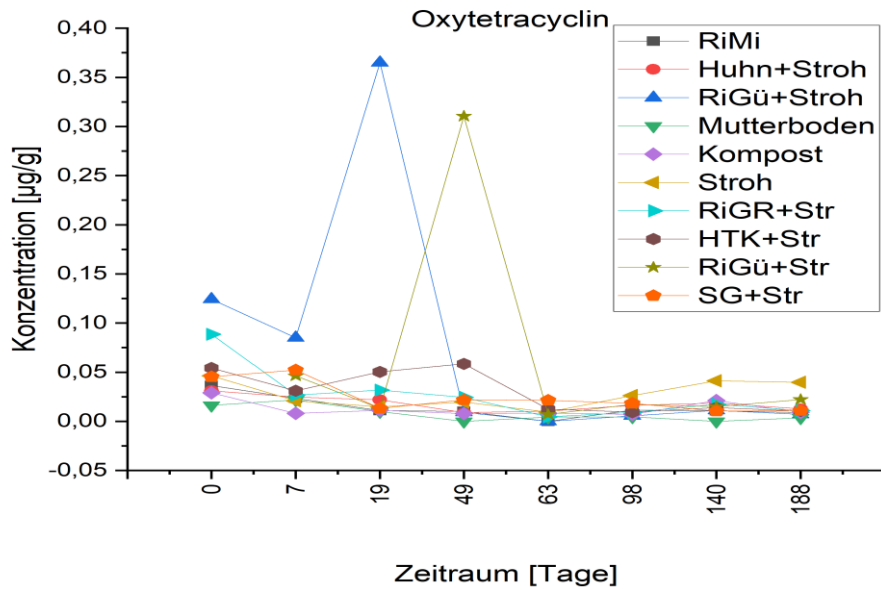


Abbildung 4.6.3.6: Abbauverhalten von Oxytetracyclin in dotierten Substraten [TM]

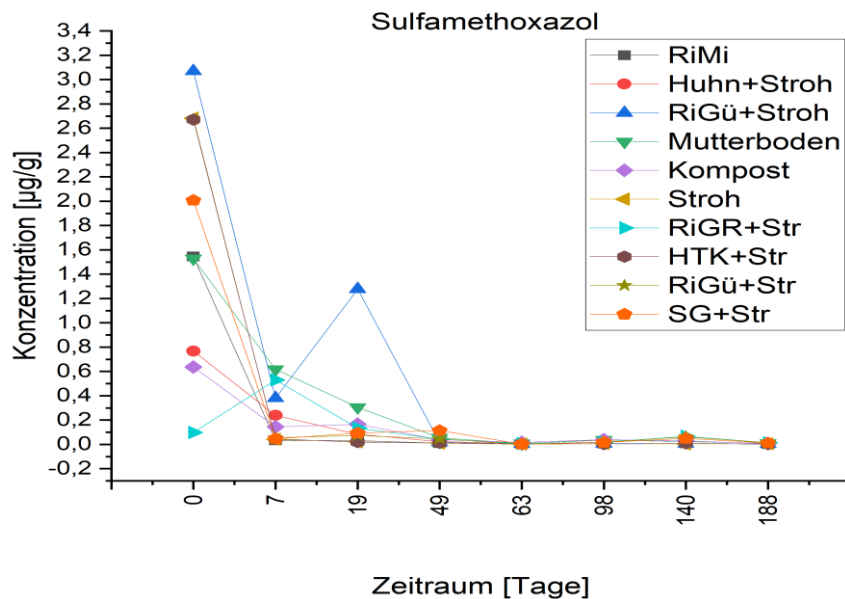


Abbildung 4.6.3.7: Abbauverhalten von Sulfamethoxazol in dotierten Substraten [TM]

Aufgrund der ursprünglich eingesetzten Dotierungen der Wirkstoffe konnte bei allen Wirkstoffen in der Gesamtsicht ein Abbau bzw. eine Eliminierung in Abhängigkeit von der Substratmatrix und dem Zeitfaktor festgestellt werden. Aerobie sowie wesentliche Anteile pilzlicher Populationen müssen in diesem Zusammenhang gesehen werden (Nicoloff und Andersson, 2016; Selvam und Wong, 2017; Reis et al., 2020). Zwischenpeaks können mit der bereits genannten „Nesterbildung“ und/oder Molekül-Restrukturierungen einzelner Wirkstoffe in Abhängigkeit von der Matrix in Zusammenhang stehen. Auch Matrixinhomogenitäten in derart komplexen Substraten müssen ursächlich gesehen werden.

Die Diskussion im Rahmen des internationalen Workshops in Weimar machte darauf aufmerksam, dass bei den gemessenen Reduktionen der Wirkstoffe besser von ‚Elimination‘ gesprochen werden sollte. Da die Vielfalt an ggf. Metaboliten und Transformationsprodukten nicht oder kaum bekannt ist, und diese zumindest nicht gezielt untersucht werden konnten, ist der Begriff ‚Abbau‘ mit Vorsicht zu gebrauchen. Dennoch soll er auch in den weiteren Betrachtungen summarisch verwendet werden.

4.7 Kleintechnische Versuche

Die Ergebnisse zu den kleintechnischen Abbauprobungen wurden im Folgenden nur für die Wirkstoffe *Enrofloxacin*, *Florfenicol*, *Lincomycin*, *Sulfamethoxazol* und *Trimethoprim* grafisch dargestellt. Die übrigen Wirkstoffe, insbesondere die β -Lactame, waren bereits nach wenigen Tagen eliminiert.

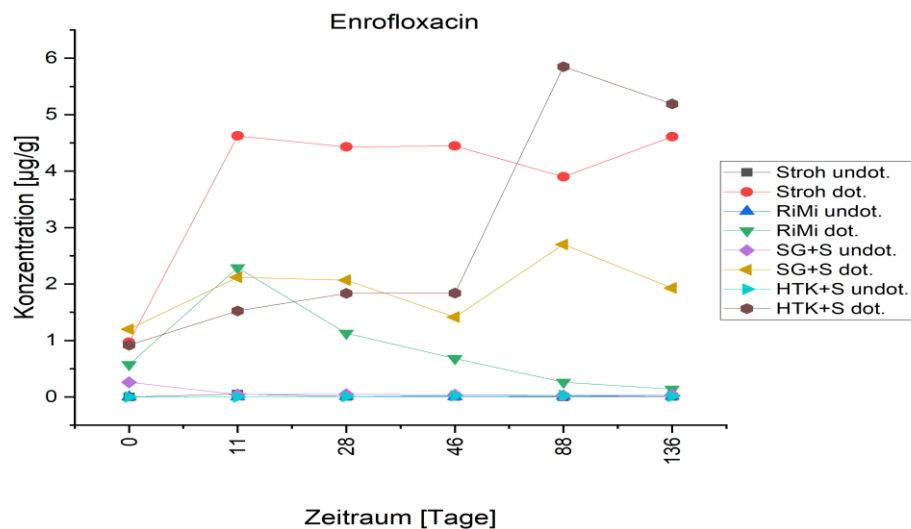


Abbildung 4.7.1: *Abbauverhalten von Enrofloxacin in dotierten Substratmatrizes [TM] (im Vergleich zu undotierten Proben mit Vorbelastung bei SG und HTK)*

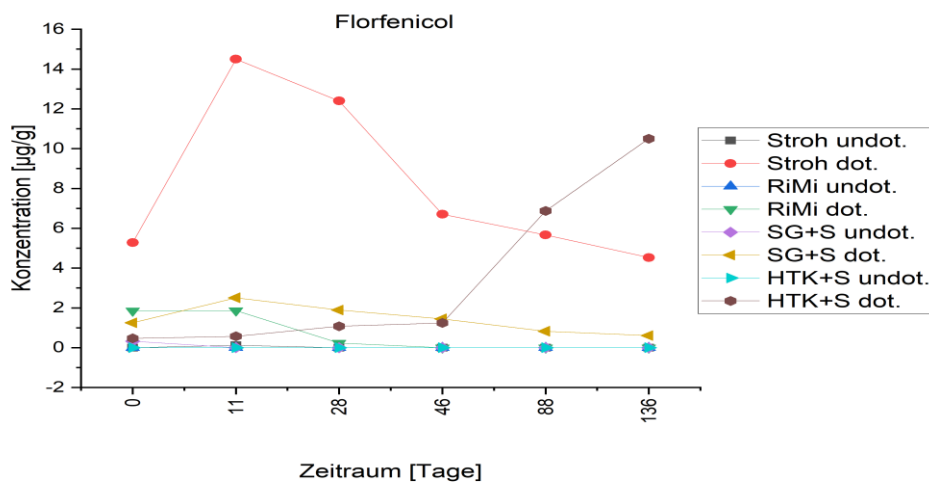


Abbildung 4.7.2: *Abbauverhalten von Florfenicol in dotierten Substratmatrizes [TM] (im Vergleich zu undotierten Proben mit Vorbelastung bei SG und HTK)*

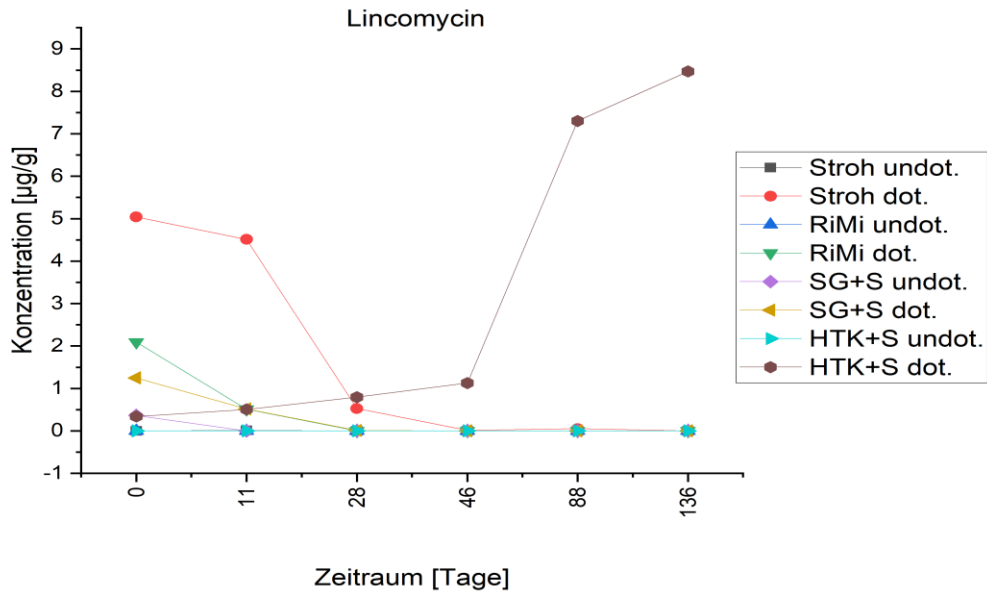


Abbildung 4.7.3: *Abbauverhalten von Lincomycin in dotierten Substratmatrizes [TM] (im Vergleich zu undotierten Proben mit Vorbelastung bei SG und HTK)*

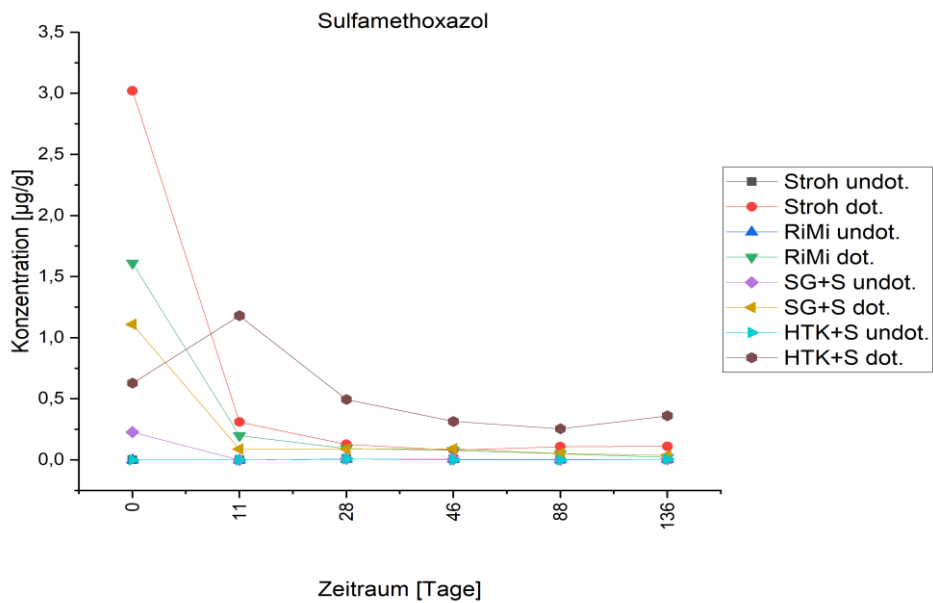


Abbildung 4.7.4: *Abbauverhalten von Sulfamethoxazol in dotierten Substratmatrizes [TM] (im Vergleich zu undotierten Proben mit Vorbelastung bei SG und HTK)*

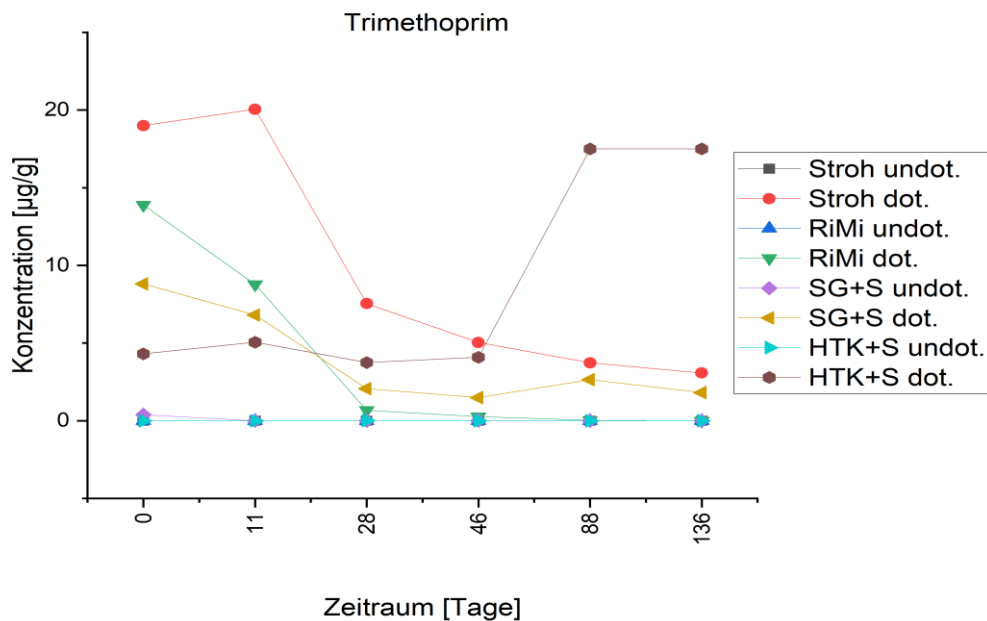


Abbildung 4.7.5: *Abbauverhalten von Trimethoprim in dotierten Substratmatrizes [TM] (im Vergleich zu undotierten Proben mit Vorbelastung bei SG und HTK)*

Klare Abbautendenzen waren bei den Wirkstoffen - neben den hier nicht dargestellten Substanzen - für *Sulfamethoxazol*, *Lincomycin* und *Trimethoprim* (ausgenommen jeweils die Matrix HTK + Stroh) festzustellen. Erklärungen für das Substrat HTK können in starken Matrixbindungen und Molekülrestrukturierungen gesehen werden. Weniger deutlich zeigten sich die Effekte bei *Florfenicol*, allerdings auch hier mit Ausnahme des HTK-Substrat.

Insbesondere bei Rindermist und Stroh waren die Abbautendenzen auffällig. Die jeweiligen Substrate, ihre mikrobiellen Populationen sowie Aerobie spielten in diesem Zusammenhang offensichtlich eine entscheidende Rolle (Nicoloff und Andersson, 2016; Leathers et al., 2017; Reis et al., 2020). Für *Enrofloxacin* waren die Effekte bei HTK, Stroh und Schweinegülle (SG) widersprüchlich. Hier muss der weitere, zeitabhängige Abbauweg über die bisherige Versuchsdauer hinaus verfolgt und validiert werden.

In parallel angelegten Versuchen zur mehrmonatigen Lagerung (Anaerobie) von Wirkstoff- belastetem Wirtschaftsdünger (*Amoxicillin*, *Enrofloxacin*, *Penicillin G*, *Sulfaguanidin* und *Tetracyclin*) konnten keine Abbau- bzw. Eliminationsprozesse nachgewiesen werden, was auch den aktuellen Untersuchungen entspricht (Bertelkamp et al., 2016; Spielmeyer, 2019).

4.8 Mikrobiologische Untersuchungen

Ein wesentlicher Effekt der Ausbringung von antimikrobiellen Wirkstoffen im Wirtschaftsdünger ist die Veränderung der mikrobiellen (autochthonen) Bodenflora. Dabei sind sowohl unmittelbare Effekte auf die Organismendichte und Zusammensetzung als auch die Ausbildung von Resistenzen zu erwarten und auch belegt. Die mikrobielle Flora des Wirtschaftsdüngers ist für den Aufschluss der Nährstoffe von Bedeutung und tritt in Wechselwirkung mit der Boden- Mikroflora. Die unmittelbaren Auswirkungen sind je nach Ausbringung lokal und temporär beschränkt.

Die Resistenzentwicklung hat ein langfristiges Potential und kann via Gentransfer vertikal und horizontal weitergegeben werden. Deshalb wurden sowohl die Veränderung des Artenspektrums von Bakterien und Pilzen als auch das Auftreten von antibiotikaresistenten Organismen geprüft.

Die Proben erwiesen sich hinsichtlich ihres Keimgehalts als relativ stabil. Die Konzentration anaerober Bakterien verringerte sich kontinuierlich.

Clostridium als hygienerelevante Gattung wurde nur in einzelnen Proben nachgewiesen. An zufällig ausgewählten Populationen aus Proben unterschiedlicher agrarbetrieblicher Herkunft wurden die Anteile von gegen ein jeweils wirksames und verwendetes Antibiotikum resistenter Kolonien gezählt (vgl. Tab. 4.8.1).

Tab. 4.8.1: Anteil resistenter Kolonien an der jeweils gezählten Population (gesamt/resistent/relativ)

| | n Enterokokken | | | n Staphylokokken | | | N Enterobacteriaceae | | | N Enterobacteriaceae | | |
|----------------|-------------------|------|---------------|---------------------|------|------------|-------------------------|------|------------|--------------------------------|------|------------|
| | ges. | res. | rel. | ges. | res. | rel. | ges. | res. | rel. | ges. | res. | rel. |
| Schweinegülle | 78 | 18 | 23% | 23 | 11 | 48% | 286 | 109 | 38% | 286 | 168 | 59% |
| Rindergülle | 140 | 1 | <1% | 12 | 9 | 75% | 160 | 44 | 28% | 160 | 72 | 45% |
| Gärrest (Rind) | 24 | 0 | 0% | 8 | 0 | 0% | 26 | 1 | 4% | - | - | - |
| Hühnerkot | 78 | 1 | 1% | - | - | - | 165 | 98 | 59% | 165 | 71 | 43% |
| | Vancomycin | | | Oxacillin | | | Amoxicillin | | | Sulfamethazol, Trimethoprim | | |

Dabei ergaben sich bei insgesamt hohen Anteilen große Schwankungen. Im Gärrest wurden generell weniger Bakterien gezählt und darunter keine ausgeprägt resistenten. Da die Bedingungen bei der Tierhaltung nicht bekannt waren, kann die Entstehung der Resistenzen und insbesondere der Einfluss der Anwendung der jeweiligen Antibiotika nicht bestimmt werden. Es ist jedoch zu konstatieren, dass erhebliche Anteile von Antibiotika-resistenten Bakterien in den verschiedenen Arten Wirtschaftsdünger enthalten sind.

Um die direkten Effekte von Antibiotika auf die mikrobiellen Populationen zu prüfen, wurden aufgrund der Wirtschaftsweise mit nur geringen Antibiotika-Konzentrationen belastete Proben dotiert. Als unterschiedlich persistente Substanzen wurden *Enrofloxacin* und *Penicillin G* angewandt. Dabei zeigte sich ein prinzipiell ähnlicher Verlauf in unterschiedlichen Zeitspannen. Als typische Situation sei die Entwicklung von Enterobacteriaceae in Rindergülle dargestellt (vgl. Abb. 4.8).

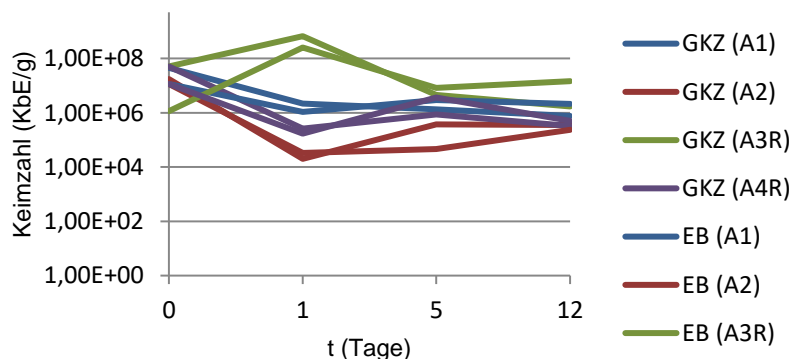


Abbildung 4.8.1: Wachstum von Bakterien in Rindergülle (unter Antibiotikaeinfluss)

GKZ: Gesamtkeimzahl aerobe Bakterien; EB: Enterobacteriaceae

A1: ohne Veränderung; A2: Zugabe Enrofloxacin;

A3R Zusatz von E. coli; A4R Zusatz von E.coli und Enrofloxacin

Die Keimzahlen der unbeeinflussten Proben (A1) nahmen im Versuchszeitraum kontinuierlich ab. Die Zugabe von Antibiotika (A2) führte unmittelbar zu einer starken Verringerung der Zahl an Bakterien um ca. 99% innerhalb eines Tages. Diese Keimzahl stieg in der Folge wieder an, wobei sowohl Enterobacteriaceae als auch die Summe aus den nicht näher spezifizierten Gruppen (GKZ) sich ähnlich verhielten. Die Dotierung mit Bakterienkulturen, sowohl mit Isolaten aus Praxisproben als auch definierten Stämme, ergab nur einen temporären Effekt (A3R), aber keine Veränderung nach Antibiotika-Zusatz (A4R). Der Wiederanstieg der Keimzahl nach Exposition gegen das Antibiotikum war nicht mit einer Erhöhung des Anteils resistenter Kolonien verbunden.

Tab. 4.8.2: Anteil resistenter Kolonien an einer jeweils gezählten Population

| | | n | | | N | | |
|-----|-----------------|--------------|------|------|--------------------|------|------|
| | | Enterokokken | | | Enterobacteriaceae | | |
| | | ges. | res. | rel. | ges. | res. | rel. |
| A1 | Rindergülle | 28 | 1 | 3% | 124 | 5 | 4% |
| A3R | RG+Enrofloxacin | 12 | 0 | 0% | 58 | 3 | 5% |
| | | Vancomycin | | | Enrofloxacin | | |

Pilze sind durch spezifische Stoffwechsellleistungen am Abbau organischen Materials wesentlich beteiligt. Deshalb ist ein Einfluss auf den Gehalt an Antibiotika sowohl direkt als auch indirekt durch Wechselwirkung mit Bakterien zu erwarten.

Die Untersuchung der Schimmelpilzfloren der (dotierten) Substrate aus den verschieden-stufigen Abbauprozessen ergab ein breites Artenspektrum. In den einzelnen Proben wurden sehr heterogen Pilze der Gattungen *Acremonium*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Trichoderma* jeweils dominierend und stabil neben einer Vielzahl weiterer Arten nachgewiesen.

Im kleintechnischen Versuch wurden nach einer Prozessdauer von ca. 5 Monaten gleichartige Populationen gefunden. Die Dotierung mit Antibiotika war in den verschiedenen Matrices jeweils mit einer erhöhten Konzentration von Schimmelpilzen korreliert.

Gärreste enthielten ebenso wie die geringsten Mengen an hygienerlevanten Bakterien auch weniger vitale Pilzbestandteile. Der Gehalt an Pilzen bei Stroh-Gemisch war generell um den Faktor 3 bis 10 erhöht. Dabei spielt der Eintrag durch das Stroh eine entscheidende Rolle. Jedoch erwiesen sich diese Erhöhungen nicht nur als stabil, sondern führten auch zu einer weiteren Vermehrung von Pilzen im Wirtschaftsdünger. Inwiefern eine Korrelation zu Abbau/Metabolisierung der Antibiotika oder ein Beitrag durch Bildung eigener spezifischer Substanzen gegeben ist, konnte bisher nicht bestimmt werden.

Die unmittelbaren und kurzfristigen Effekte durch Antibiotika in den angewandten praxisrelevanten Konzentrationen sind insgesamt als gering zu bezeichnen. Die Gehalte an hygienisch bedeutsamen Bakteriengruppen veränderten sich überraschenderweise nicht wesentlich. Die Dotierung mit Mikroorganismen führte bisher nicht zu stabilen Veränderungen des Artenspektrums. Die Zugabe von „Starter“-kulturen dürfte die Metabolisierung von Antibiotika daher kaum fördern.

Dass keine direkte Selektion von resistenten Stämmen nachgewiesen werden konnte, weist darauf hin, dass das anzunehmende Problem eher im horizontaler Transfer von Resistenzgenen liegt. Die Ausprägung von Antibiotikaresistenzen ist ein dynamischer Prozess, wobei die Tests an Isolaten die Situation in komplexer Umgebung möglicherweise nicht vollständig widerspiegeln (*Galera-Laporta und Garcia-Ojalvo*, 2020). Langfristig wird die Bildung eines Reservoirs solcher Gene in verschiedenen Arten gefördert. Die Nachverfolgung der Verbreitung von Resistenzgenen wird zunehmend wichtiger.

Chemisch-analytische Betrachtung zur mikrobiologischen Untersuchung

Ziel:

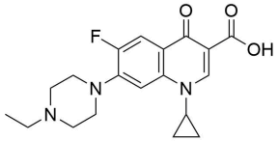
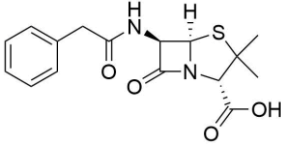
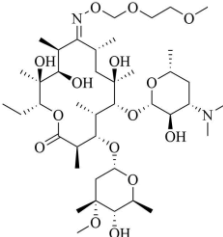
Vergleichende Betrachtung zum Um-/Abbau ausgewählter Antibiotika bei gleichzeitiger Untersuchung der mikrobiellen Zusammensetzung. Anhand dotierter frischer Proben wird der Abbau einzelner Substanzen durch tägliche Messung nachvollzogen und analog die Veränderung in der mikrobiellen Zusammensetzung beobachtet.

Vorbereitung:

Tab. 4.8.3: Übersicht der untersuchten Substanzen

| Substanz | Summenformel | CAS | MW [g·mol ⁻¹] | LM | Einwaage [mg] |
|--------------------|---|------------|------------------------------|----------------|------------------------------|
| Enrofloxacin | C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃ | 93106-60-6 | 359,39 | RW:AcN 1:1 +US | 10 |
| Penicillin G | C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S | 61-33-6 | 334,39 | MeOH | 11,14 (K ⁺ -Salz) |
| Roxithromycin (IS) | C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅ | 80214-83-1 | 837,05 | MeOH | 10 |

Tab. 4.8.4: Struktur der eingesetzten Substanzen

| Enrofloxacin | Penicillin G | Roxithromycin |
|---|---|--|
|  |  |  |
| Fluorchinolon | β-Lactam-Antibiotikum | Makrolidantibiotikum |

Proben: Rindergülle (**RG**) + Stroh (**S**) (50:50)
gefriergetrocknet, gemahlen, aliquotiert (1 g)

MRM-Übergänge

Tuning-Lösung: RW 50 %, AcN 50 %, Ameisensäure 0,1 % (v/v), 1 mM Ammoniumacetat
Konzentration: 1 µg/mL

Tab. 4.8.5: Massenübergänge und Retentionszeiten der untersuchten Substanzen

| Substanz | MRM Übergänge (m/z) | RT in Lösung (min) |
|-------------------------|---------------------|--------------------|
| <i>Enrofloxacin</i> | 360 → 316 | 7,36 |
| | 360 → 342 | |
| <i>Penicillin G</i> | 335 → 160 | 9,78 |
| | 335 → 176 | |
| <i>IS Roxithromycin</i> | 837 → 679 | 9,85 |
| | 837 → 158 | |

Auswertung

Die Bestimmung der Konzentration erfolgte durch Kalibrierung mit Referenzstandards und internem Standard. Die Messungen erfolgten in Doppelbestimmung. Der Untersuchungszeitraum belief sich auf 37 Tage mit anfänglich täglicher Probennahme. Der Ansatz der beprobten Matrix (zu gleichen Teilen Rindergülle mit Stroh vermengt) wurde parallel einer mikrobiologischen Untersuchung unterzogen. Nach der Dotierung wurde der Ansatz unter aeroben Bedingungen und bei Raumtemperatur täglich mechanisch homogenisiert und die relative Feuchtigkeit (ca. 50%) mittels Feuchtwaaage überprüft.

Die untersuchten Substanzen unterschieden sich deutlich in ihrem Ab- bzw. Umbauverhalten. *Penicillin G* aus der Gruppe der β -Lactam-Antibiotika und dessen Salze sind gut wasserlöslich und säureinstabil. Hieraus resultiert eine geringe Stabilität auf allen Tierkotmatrices. Penicilline werden in die stabilere Säureform (*Penicillinsäure/Penicillinsäure*) umgewandelt. Die Detektion der Ausgangsverbindung *Penicillin G* war somit auf die beschriebene Vorgehensweise nicht mehr möglich. Durch die Untersuchung einer säurestabileren Penicillinform [*Penicillin V (Phenoxymethylpenicillin)*] könnte die Umwandlung im Verlauf des Abbauprozesses besser nachvollzogen werden.

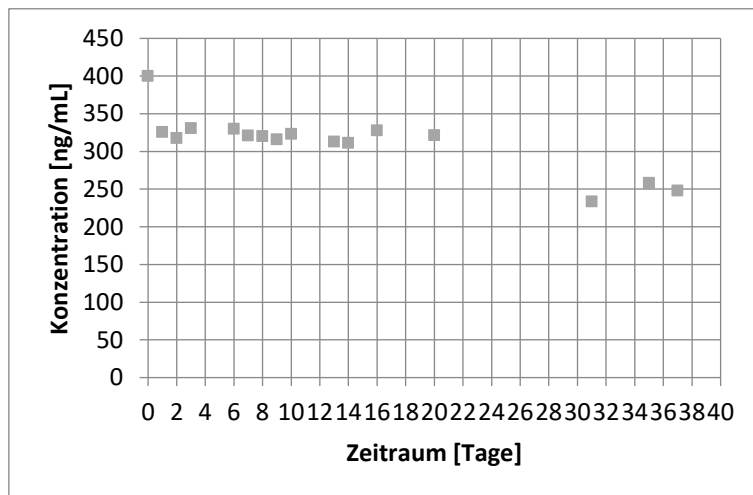


Abbildung 4.8.2: Errechnete Konzentrationen während des Abbaus von *Enrofloxacin*

Die Bestimmung der Konzentration an *Enrofloxacin* zur Untersuchung des Ab- bzw. Umbaus in der Rindergüllematrix zeigt eine deutliche Stagnation zwischen Tag 1 und Tag 20. Erst danach beginnt eine langsame Abnahme der gemessenen Konzentration. Da es sich um die Beprobung von frischem Ausgangsmaterial handelt, ist davon auszugehen, dass zunächst eine Adaption des Mikrobioms an die erhöhte Menge des Antibiotikums erfolgt, bevor die Transformation bzw. Metabolisierung stattfindet. Da keine Aufstockung der Proben erfolgte, wurden die gemessenen Konzentrationen auf die anfänglich dotierte Konzentration normiert ($c_{ist} = \frac{c_{gemessen} \cdot c_{soll}}{c_0}$).

Enrofloxacin als Vertreter der Fluorchinolone weist im Vergleich zu *Penicillin G* eine deutlich höhere Bioverfügbarkeit auf. Entsprechend ist die Stabilität in der Matrix höher und dadurch bedingt der analytische Nachweis wesentlich sensitiver. Der Hauptmetabolit *Ciprofloxacin*, welcher ebenfalls eine bakterizide Wirkung aufweist, eignet sich als Referenz für die Untersuchung des Abbaus bzw. der Umwandlung.

Die Bestimmung der Konzentration an *Enrofloxacin* zur Unter-

4.9 Wirtschaftlichkeitsabschätzung

Ausgehend von den Analysen zum Abbau von Antibiotika unter verschiedenen, für die Praxis geeigneten Bedingungen hat sich herauskristallisiert, dass die nachfolgend beschriebene Methode der Behandlung grundsätzlich machbar erscheint. Dabei ist zu berücksichtigen, dass dies vorerst eine Berechnung darstellt, um ausgehend von Ergebnissen im Technikumsmaßstab eine grobe Abschätzung von Behandlungskosten durchzuführen.

- Herstellung einer stapelbaren Mischung aus den zu behandelnden Exkrementen und Stroh bzw. Festmist, das bei Aufschüttung luftdurchlässig ist und eine Schütthöhe von bis zu 1 m ermöglicht
- Herstellung einer Aufschüttung von bis zu 1 m Höhe; vorerst wird von einer Miete mit in etwa dreiecksförmigem Querschnitt ausgegangen, damit eine große Oberfläche existiert, die Luftsauerstoff in die Miete einlässt
- Lagerung für einen Zeitraum von etwa 5,5 Monaten
- Einmalige Umsetzung während dieses Zeitraumes zur Homogenisierung der Miete
- Befeuchtung nach Bedarf bei der Umsetzung der Miete sowie in den Sommermonaten zweimalig im Jahr; d.h. einmal zusätzlich während der Mietenlagerdauer im Durchschnitt
- Ausbringung der behandelten Mischung analog zu Festmist

Ausgehend von dieser Systembeschreibung wird in den nachfolgenden Tabellen 4.9.1 und 4.9.2 für verschiedene Exkrementarten eine sehr grobe Wirtschaftlichkeitsberechnung durchgeführt.

Tabelle 4.9.1: Technische Charakterisierung der Behandlung von Exkrementen am Beispiel einer einheitlichen Menge von 100 t

| Exkrementart | Einheit | Rinderfestmist | Rindergülle | Schweinegülle |
|--|----------------------|----------------|-------------|---------------|
| Trockensubstanzgehalt | % der Frischsubstanz | 25 | 8 | 2 |
| Behandlungsmenge | t | 100 | 100 | 100 |
| Strohbedarf zur Erreichung von 25 % Trockensubstanz | t | 0 | 294 | 1592 |
| Gesamtmenge zur Behandlung | t | 100 | 394 | 1692 |
| Mietenlänge | m | 286 | 1126 | 4835 |
| Fläche zur Behandlung | m ² | 403 | 1588 | 6818 |
| Radladernutzung Mischen und Aufsetzen | h | 14 | 56 | 242 |
| Radladernutzung Miete Mischen | h | 5 | 19 | 81 |
| Radladernutzung Mietenabbau | h | 2 | 9 | 40 |
| Wassermenge | m ³ | 14 | 56 | 242 |
| Restmenge nach 5,5 Monaten | t | 85 | 242 | 895 |
| Annahmen: | | | | |
| Schüttdichte 350 kg/m ³ ; Mietenquerschnitt: 1 m ² bei 1 m Höhe Dreiecksmiete; Grundfläche: 1,41 m ² /m Länge; Substratmischung und Mietenaufbau 3 min pro Meter mit Radlader; Stroh: 90 % TS | | | | |
| Mietendurchmischung 1 min pro Meter mit Radlader; Mietenabbau 0,5 min pro Meter mit Radlader; Abtransport und Ausbringung: nur für Strohanteil (Exkreme würden sowieso ausgebracht) | | | | |
| Strohmenge wird durch biologischen Abbau um 50 % reduziert; Exkrementemenge bei Festmist um 15 %; bei Rindergülle um 5%; bei Schweinegülle um 1%; Gesamtbefeuchtung: 50 Liter pro Meter Miete | | | | |

Tabelle 4.9.2: Ökonomische Auswertung der Behandlung von Exkrementen am Beispiel einer einheitlichen Menge von 100 t

| Exkrementart | Einheit | Rinderfestmist | Rindergülle | Schweinegülle |
|--|---------|----------------|-------------|---------------|
| Strohbereitstellung (70 €/t) | € | 0 | 20.596 | 111.462 |
| Fläche, befestigt (10.000 €/ha/a) | € | 201 | 794 | 3.409 |
| Radladernutzung mit Fahrer (100 €/h) | € | 2.143 | 8.448 | 36.264 |
| Brunnenwasser (2 €/m ³) | € | 29 | 113 | 484 |
| Ausbringungskosten Strohanteil (5 €/t) | € | 0 | 736 | 3.981 |
| Gesamtkosten 100 t Exkreme | € | 2.373 | 30.686 | 155.598 |
| spezifische Gesamtkosten | €/t | 24 | 307 | 1.556 |

Ausgehend von der obenstehenden Auswertung wird deutlich, dass selbst die einfachste technische Maßnahme zur Behandlung von Exkrementen zur Reduktion von Antibiotika vor der Ausbringung als Dünger zu hohen spezifischen Kosten führt. Bei der direkten Behandlung von Rinderfestmist bedeutet dies bei einer typischen Festmistmenge von 11,29 dt/Monat¹ für eine 8.000-Liter-Milchkuh Behandlungskosten von 321 € pro Kuh bzw. 4 ct/Liter Milch. Hinsichtlich der Behandlung von Rindergülle vervielfachen sich diese Kosten etwa um den Faktor 10.

Diese Analyse zeigt sehr deutlich, dass vor der Festlegung selbst einfachster Maßnahmen eine extrem hohe Sicherheit bestehen muss, dass die Maßnahme eine wissenschaftlich erwiesene Reduzierung der Antibiotikaausbringung bewirkt. Die Analyse zeigt aber noch vielmehr, dass Mehrkosten, die durch den Verzicht auf Antibiotika, z.B. durch geringere Milch- oder Fleischleistung entstehen, mit großer Sicherheit vorteilhaft gegenüber nachgelagerten Maßnahmen zur Behandlung von Exkrementen sind. Bei einer einfachen Miststapelung (ohne weiteres Umsetzen) oder aber direktem Tretmist reduzieren sich die Kosten auf nahe Null. Dies soll mit Blick auf ABIOTEC II eine entscheidende, insbesondere auch wirtschaftliche Orientierung und Ausrichtung vorgeben.

4.10 Internationaler Workshop

Im Rahmen der Organisation des Workshops wurde sowohl bei den Referenten als auch bei den Teilnehmern eine hochkarätige internationale Besetzung erreicht. Insgesamt haben 32 Wissenschaftler und Wissenschaftlerinnen aus Deutschland, Schweden, Großbritannien und der Schweiz teilgenommen. Die Teilnehmer haben sowohl im Kontext der Präsentationen führender Wissenschaftler diskutiert, als auch direkt in Arbeitsgruppen zu konkreten Forschungsfragen gearbeitet. Der Workshop hat zu einem intensiven Austausch, aber besonders zur internationalen Wahrnehmung der Forschergruppe an der MFPA Weimar geführt. Mit einigen Teilnehmern wird weiterhin ein enger wissenschaftlicher Austausch gepflegt.



Abbildung 4.10.1: Gruppenbild des internationalen Workshops am 10. und 11. Januar 2019



Abbildung 4.10.2: Gruppenarbeit während des internationalen Workshops am 10. und 11. Januar 2019

Genauere Informationen zum Workshop können der *Workshopdokumentation* im Anhang 3 dieses Berichtes sowie ergänzend dem Kapitel 5 entnommen werden.

¹ <http://www.landwirtschaftskammern.de/pdf/guelledaten-rinder.pdf>

5. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Entwicklung einer geeigneten robusten LC-MS- Messmethode (am API 2000) zum Nachweis antibiotischer Wirkstoffe stand im Mittelpunkt der Arbeiten im Projekt ABIOTEC an der MFPA Weimar. Neben intensiven Recherchen zu aktuellen analytisch-messmethodischen Entwicklungen waren umfangreiche Recherchen zu den relevanten antibiotischen Substanzen, ihren Metaboliten und Transformationsprodukten notwendig. Hierzu konnten Befragungen und Gespräche mit Behörden, Tierärzten und Agrarbetrieben zum Einsatz der Antibiotika bei Geflügel, Schwein und Rind zielführend durchgeführt werden. Aufbauend auf dem Thüringer Antibiotika- Monitoring der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft (TLL) wurden somit weitergehende Aktualisierungen vorgenommen. Neben der umfangreichen Beschaffung von Referenzmaterial führten die Arbeiten zu einer den weiteren Projektzielen angepassten, selektiven und ausreichend sensitiven Screeningmethode. Die Probenvorbereitung und Methodvalidierung konnte im Rahmen der Anreicherung über Festphasenextraktion (SPE) unterstützt werden. Mittels Dotierung sauberer Proben wurde ein Ringtest vorbereitet und durchgeführt. Des Weiteren konnten hinsichtlich der Entwicklung eines neuartigen agrobiotechnologischen Verfahrens technische Ansätze und Experimente zu Abbauprozessen in Düngematrices im labor- und kleintechnischen Maßstab erfolgreich erfolgen. Diese stehen im Rahmen der Erweiterung auf den halbtechnischen Maßstab (ABIOTEC II) zur Verfügung.

Qualitative und quantitative Untersuchungen zur kultivierbaren bakteriellen Besiedlung von verschiedenen Wirtschaftsdüngern/Matrices hinsichtlich der Entwicklung einer Prüfroutine zur Beurteilung antibiotischer Effekte wurden vom IUML Erfurt erfolgreich durchgeführt. Dabei spielte die Erarbeitung von Aufbereitungsverfahren in Abhängigkeit von Konsistenz und Wassergehalt der Wirtschaftsdünger- Proben (Homogenisierung, quantitative Auswertung in Realproben, Versuche zur Stabilität der Mikroflora) eine entscheidende Rolle. Es konnten Voraussetzungen für eine fortlaufende Prüfung der Entwicklung Antibiotika- resistenter Bakterien in Gülle und Gärprodukten sowie des daraus resultierenden Eintrags in die Umwelt erarbeitet werden.

Der Agrarbetrieb stellte den Wirtschaftsdünger (Rindergülle, Gärrest) bereit und war beratend projektintegriert sowie permanent an den Fortgang des Projektes angeschlossen und informiert, was sich als sehr förderlich und wichtig für den Projektverlauf erwies. Geflügelkot und Schweinegülle konnte von anderen Agrarbetrieben gewonnen werden.

Die Methodenentwicklung im Rahmen des Nachweises der antibiotischen Stoffe und ihrer Metaboliten gestaltete sich als wesentlich aufwendiger und zeitintensiver als ursprünglich geplant. Die Analytik konnte durch Optimierungen schrittweise verbessert werden. Auch Fragen der Entwicklung der Probenvorbereitung und Methodvalidierung wurden intensiv bearbeitet. 38 verschiedene Substanzen der verschiedenen Wirkstoffklassen konnten untersucht und die Verfahren methodisch angepasst werden. Das analytisch sehr kritische Problem der Metaboliten und Transformationsprodukte konnte dabei aufgrund der Vielfalt an Substanzen nur beispielhaft angearbeitet werden und soll im nachfolgenden Projekt ABIOTEC II eine größere Rolle spielen.

Im Anschlussprojekt soll aufbauend auf ABIOTEC (I) die analytische Methode für die Bestimmung antibiotischer Substanzen, insbesondere deren Metaboliten und Transformationsprodukte in den Matrices Gülle, Jauche, Gärrest und Festmist weiterentwickelt und validiert werden. Dabei sollen vor allem die Wirkstoffgruppen β -Lactame (gut abbaubar) und Fluorchinolone (schwer abbaubar) im Fokus der Untersuchungen stehen. Eine sichere Abbaubilanzierung antibiotischer Substanzen durch Input- und Output-Messungen inklusive der wichtigsten Metaboliten kann mit einer weiterentwickelten Analytik erfolgen.

Die Fortführung des ökologisch ausgerichteten Projekts soll dabei für die Entwicklung innovativer „low tech“- und „low cost“- Verfahrensansätze zum Abbau von Antibiotika in Wirtschaftsdünger im Sinne ihrer Überführung in den großtechnischen Pilotmaßstab dienen, und eine adäquate reproduzierbare und sichere Analytik bereitstellen.

Im Rahmen von ABIOTEC wurden insgesamt 8 interne Projekt- Workshops in enger Zusammenarbeit mit der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft zielführend und gegenseitig unterstützend durchgeführt. Die nachfolgenden, wesentlichen Erkenntnisse des internationalen Workshops im Januar 2019 in Weimar unterstreichen die Bedeutung und Sinnhaftigkeit weiterer Forschung und fortführender Projektarbeiten:

- Ein großer Teil der veterinärmedizinischen Antibiotika, die therapeutisch und vorbeugend bei Nutztieren eingesetzt werden, werden in die Umwelt freigesetzt. Dort bleiben sie oft sehr lange Zeit in verschiedenen Kompartimenten erhalten/bestehen.
- Antibiotika- Verbindungen werden von den landwirtschaftlichen Flächen in Oberflächengewässer und in kritischen Fällen sogar in das Grundwasser transportiert - ein erhebliches Risiko für die menschliche Gesundheit.
- Bei einigen Antibiotika, die im Boden oder im Wasser nicht mehr nachweisbar sind, besteht der Verdacht, dass sie abgebaut oder in andere Substanzen (Metaboliten, Transformationsprodukte) umgewandelt werden, die als ebenso kritisch anzusehen sind.
- Die möglichen Auswirkungen von Antibiotika in der Umwelt sind weitestgehend klar und beschrieben, da sie bereits über viele Jahre beobachtet werden (u.a. Verstärkung von Resistenzen durch Selektionsdruck, Ausbildung von Multiresistenz). Es ist jedoch nicht klar, welche Antibiotika und Mengen (Grenzwerte) in die Umwelt gelangen können, bevor die Auswirkungen festgestellt werden.
- Es gibt mehrere Bereiche, in denen weitere Forschung erforderlich ist, um die Auswirkungen von Antibiotika auf die Umwelt und folglich auf die Gesundheit von Mensch und Tier beurteilen zu können. Bis dies erreicht ist, ist es entscheidend, dass Mechanismen eingerichtet werden, um die Mengen und Pfade von Antibiotika, die in der Tierhaltung verwendet werden, zu überwachen, damit Korrelationen hergestellt und Lösungen gefunden werden können.
- Die Intensivierung und weitere Erforschung von (praxis- und kostenrelevanten) Abbauprozessen in den unterschiedlichen Umweltkompartimenten sind erforderlich und wünschenswert.

Die Ergebnisse und Erkenntnisse aus ABIOTEC stimmen sehr optimistisch. Der aerobe Abbau bzw. die Elimination mit oder ohne vorherige Anaerobstufe ist machbar und umsetzbar, wobei die einzelnen Substanzen gut (z.B. β -Lactame) bzw. schwer abbaubar (z.B. Fluorchinolone, Phenicole) sind. Die folgenden verfahrenstechnischen Ansätze bzw. Schwerpunkte sind erkennbar; ihre Weiterentwicklung und Optimierung zur praxisnahen Erprobung und Anwendung stehen noch aus:

- Strohvermischung
- Rotteprozess/Kompostierung
- Aerobe Gärrestbehandlung
- Bodenbehandlung

Die für die sehr unterschiedlichen und komplexen Düngematrixen in ABIOTEC etablierte analytische **Screeningmethode** sollte zukünftig hinsichtlich der Metaboliten bzw. Transformationsprodukte mittels HR-LCMS weiterentwickelt werden.

Der erste Schritt einer umfänglichen Methodenentwicklung in ABIOTEC ist als wichtige Basis für fortführende Entwicklungen (ABIOTEC II) etabliert. Die zu den Untersuchungen zum Abbau bzw. der Transformation der antibiotischen Stoffe notwendige Analytik bzw. Messmethodik soll schließlich in Ansätzen in einen aufbauenden, weiterentwickelten Normentwurf fließen. Die *Tabelle 5* stellt ABIOTEC (I) und das geplante fortführende Projekt ABIOTEC II im Ausblick vergleichend gegenüber.

Tabelle 5.: Gegenüberstellung der Projekte ABIOTEC (I) und ABIOTEC II

| Kategorie | ABIOTEC (I) | ABIOTEC II |
|--|---|---|
| Substrat | Wirtschaftsdünger | Schwerpunkt stabilisierte Substrate, z.B. Gärrest |
| Verfahren | Konzept (labor- bzw. kleintechnischer Maßstab) | Verschiedene Konzepte (halbtechnischer Maßstab) |
| Düngeverordnung | | Empfehlungen |
| Wesentliche weitere Aspekte des Projekts | Mikrobiologisch-hygienische Qualität und Prüfroutine; analyt. Methodik für Wirtschaftsdünger, Standardisierung/ Validierung | Erfassung des Vorkommens bakterieller Resistenz, Prüfung des Vorkommens von ausgewählten Resistenzgenen, Untersuchung von human-/veterinärmedizinisch relevanten sowie phytopathogenen Organismen, Kombination von kulturellen und molekularbiologischen Methoden |
| Anbaubezug | | halbtechnischer Maßstab |
| Abbau von Veterinärpharmaka | Antibiotika (und Metaboliten) | Gut und schwer abbaubare Antibiotika (Beta-Lactame, Fluorchinolone), ihre Metaboliten und Transformationsprodukte |
| Spezifik Agrartechnik | | Weiterentwicklung und Anpassungen an vorhandene Technik |
| Probenahme | Wirtschaftsdünger allgemein | Schwerpunkt Gärrest aus Biogasanlage |

Durch genauere Kenntnis der selektiven Wirkungen auf das Wachstum von gesundheitlich relevanten Gruppen von Mikroorganismen werden Ansätze zu einer Auswahl von Indikatoren für eine Bewertung möglich. Wechselwirkungen mit der jeweils autochthonen Flora, neben Bakterien auch Pilze vor allem bei Strohvermischung und Bodenbehandlung, sollen Möglichkeiten für die Wirksamkeit solcher Verfahrensbestandteile aufzeigen.

Untersuchungen mittels kultureller und molekularbiologischer Verfahren können Veränderungen des Bakterienspektrums aufzeigen. Zusammen mit den Nachweisen von Resistenzgenen stellt dies eine erweiterte Betrachtung des potentiellen Risikos für den Eintrag von Resistenzen durch Gülle, Stallmist und Gärprodukte dar. In diesem Sinne ist sie auch als Bestandteil der Handlungsoptionen und Schwerpunktsetzung des Umweltbundesamtes von Bedeutung (UBA, 2018, 2019).

In weiterführenden Versuchen sollte daher die Verbreitung der spezifischen Resistenz gegen die ausgewählten Antibiotika in den unterschiedlichen Bakteriengruppen über den längeren Zeitraum der Behandlung verfolgt werden. Die Prüfung von Enterobacteriaceae und Enterokokken als Indikatoren kann die Entwicklung der mikrobiellen Flora anzeigen. Daneben und somit ergänzend soll die davon verschiedene Entwicklung von Clostridien als Anaerobier verfolgt werden.

Weiterhin spielen in den Untersuchungen die Auswirkungen der Pilzflora auf die Metabolisierung eine größere Rolle. Deren nähere Charakterisierung wird ein Baustein zukünftiger Untersuchungen sein. Die Auswahl von Indikatoren als Basis für eine praktikable Prüfroutine zur Hygienisierung und Resistenzausbringung soll in allen Prozessstadien bestätigt werden (vgl. Pospiech et al., 2014).

Die sehr positive, immer vertrauliche und kooperative Zusammenarbeit und der regelmäßige Erfahrungsaustausch mit der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft (insbesondere Labor und Innovationsdienstleister; heute TLLLR) sowie der Thüringer Aufbaubank, auch im Rahmen der internen Workshops und Gespräche, erwies sich als sehr wichtig und projektunterstützend und sollte unbedingt fortgeführt werden. Eine gemeinsame projektinterne Betriebsbesichtigung im Agrarunternehmen vor Ort konnte das laufende Vorhaben in vielfältiger Weise praxisrelevant unterstützen.

6. Zusammenfassung

In der modernen Tierhaltung werden antibiotische Wirkstoffe zum Schutz der Tiere therapeutisch eingesetzt. Bei der stofflichen Nutzung der Wirtschaftsdünger gelangen diese sowie deren Metaboliten auf die Böden und können die Kulturpflanzen, den Wasserkreislauf inkl. das Grundwasser kontaminieren. Umfangreiche Recherchen und Gespräche mit Landwirten und Veterinärmedizinern zu den in der Praxis bei Schwein, Huhn und Rind in Thüringen eingesetzten Substanzen bestätigten die Tendenz hin zu Wirkstoffen, die bei Applikation im niedrig dosierten Bereich liegen. Dies kommt dem gesamtgesellschaftlichen Ziel einer Reduzierung der eingesetzten Tonnagen entgegen.

Die Entwicklung einer ausreichend empfindlichen, robusten und innovativen matrixunabhängigen Screening- Analytik am API 2000 inkl. geeigneter Probenvorbereitung als notwendige Voraussetzung für den Nachweis des Abbaus dieser sehr heterogenen Wirkstoffe, ihrer Metaboliten und Transformationsprodukte in den einerseits verschiedenen und andererseits sehr komplexen und analytisch schwierigen Matrices Gülle, Jauche, Gärrest und Festmist wurde im Rahmen des Projektes intensiv verfolgt. Mit der LC-MS- Methode konnten bei vertretbarem, optimiertem Aufwand große Probenmengen hinsichtlich des breiten Spektrums an eingesetzten Wirkstoffen untersucht werden.

Die Ergebnisse ermöglichten die Erstellung eines ersten Normentwurfes, der vorbereitet werden konnte und Thüringer Labors die Chance bietet, die im internationalen Vergleich herausragenden Erfahrungen auszubauen. Innerhalb eines (wenn auch eingeschränkten) Ringversuchs konnte die Methode am API 4000 validiert werden. Eine Bilanzierung der Stoffströme z.B. bei Gülle- verwertenden Biogasanlagen wird zukünftig möglich. Begleitend wurde eine mikrobiologische Prüfroutine entwickelt und durch hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen im Projektverlauf ergänzt.

Verfahrenstechnische und in der Praxis für den Agrarbetrieb zukünftig umsetzbare Ansätze für agrobiotechnologische Behandlungsstufen von Wirtschaftsdünger, die die Konzentrationen von Antibiotika und ihrer Abbauprodukte im Wirtschaftsdünger signifikant reduzieren, konnten im Labor- und kleintechnischen Maßstab identifiziert und entwickelt werden. In diesem Zusammenhang ist insbesondere auf die Strohvermischung hinzuweisen. Die Basis für ein technologisch und ökonomisch umsetzbares Verfahren für den Einsatz in landwirtschaftlichen Unternehmen zur Reduzierung antibiotisch wirksamer Substanzen, ihrer Metaboliten und Transformationsprodukte wurde gelegt. Es kann im Rahmen aktueller Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen in den halb- und großtechnischen Maßstab überführt werden.

Ziel des in Weimar durchgeführten internationalen Workshops war es, Messmethoden und Herausforderungen in Bezug auf den Einsatz von Antibiotika für Veterinärmedikamente zu erkunden und Strategien zum Umgang mit den mit ihrem Einsatz verbundenen Problemen zu reflektieren. Der Workshop gestaltete sich aus der Sicht aller Beteiligten als voller Erfolg.

Das Projekt wird damit den Interessen der Landwirtschaft und der Gesellschaft insgesamt umfänglich gerecht. Es dient einer langfristig sicheren Produktion gesunder landwirtschaftlicher Futter- und Lebensmittel, einer sicheren Verwertung von landwirtschaftlichen Rückständen und Abfällen und stellt einen innovativen Beitrag zum umfassenden Umweltschutz dar.

7. Literaturverzeichnis

- Achermann, S.; Bianco, V.; Mansfeldt, C.B.; Vogler, B.; Kolvenbach, B.A.; Corvini, B.F.X.; K. Fenner (2018): Biotransformation of Sulfonamide antibiotics in activated sludge: The formation of Pterin-conjugates leads to sustained risk. *Environ Sci Technol* 52 (11): 6265 – 6274.
- Achermann, S. (2019): Biotransformation of Sulfonamide antibiotics in activated sludge. Workshop *Antibiotics in Manure and Digestate*, Weimar, January 10th – 11th.
- Alvarez, J.A.; Otero, L.; Lema, J.M.; F. Omil (2010): The effect and fate of antibiotics during the anaerobic digestion of pig manure. *Bioresource Technology* 101 (22): 8581 – 8586.
- Arikan, O.A.; Mulbry, W.; C. Rice (2008): Management of antibiotic residues from agricultural sources: use of composting to reduce chlortetracycline residues in beef manure from treated animals. *J Hazard Mater* 164 (2-3): 483 – 489.
- Bengtsson-Palme, J.; D.G.J. Larsson (2015): Antibiotic resistance genes in the environment: prioritizing risks. *Nature Rev Microbiol* 13: 396.
- Bertelkamp, C.; Verliefde, A.R.D.; Schoutteten, K.; Vanhaecke, L.; Bussche, J.V.; Singhal, N.; J.P. van der Hoek (2016): The effect of redox conditions and adaptation time on organic micropollutant removal during river bank filtration: A laboratory-scale column study. *Sci Tot Environ* 544: 309 – 318.
- Boix, C.; Ibanez, M.; Sancho, J.V.; N. Leon (2019): Qualitative screening of 116 veterinary drugs in feed by liquid chromatography-high solution mass spectrometry: Potential application to quantitative analysis. *Food Chemistry* 160: 313 – 320.
- Boxall, A.B.; Fogg, L.A.; Blackwell, P.A.; Kay, P.; Pemberton, E.J.; A. Croxford (2004): Veterinary medicines in the environment. *Rev Environ Contam Toxicol* 180: 1 – 91.
- Boxall, A.B.; Johnson, P.; Smith, E.J.; Sinclair, C.J.; Stutt, E.; L.S. Levy (2006): Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *J Agric Food Chem* 54 (6): 2288 – 2297.
- Boxall, A.B. (2019): Fate and effects of veterinary medicines emitted to the environment in manure and slurries. Workshop *Antibiotics in Manure and Digestate*, Weimar, January 10th – 11th.
- BVL (2019): Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit: Erneut weniger Antibiotika in der Tiermedizin abgegeben. Regionale Zuordnung der Antibiotika-Abgabemengen 2018.
- Carballa, M.; Omil, F.; Ternes, T.; J.M. Lema (2007): Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Research* 41 (10): 2139 – 2150.
- Carter, L.J.; C.A. Kinney (2018): Terrestrial Ecotoxicity, Health Care and Environmental Contamination. 10.1016/B978-0-444-63857-1.00005-X, (69-85).
- Christou, A.; Agüera, A.; J.M. Bayona; Cytryn, E.; Fotopoulos, V.; Lambropoulou, D.; Manaia, C.M.; Costas, M.; Revitt, M.; Schröder, P.; D. Fatta-Kassinou (2017a): The potential implications of reclaimed water reuse for irrigation on the agricultural environment: the knowns and unknowns of the fate of antibiotics and antibiotic resistant bacteria and resistant genes – A review. *Water Research* 123: 448 – 467.
- Deutscher Bundestag (2018): Unser Wasser vor multiresistenten Keimen schützen. BT- Drucksache 19/1159.

- Farre' la, M.; Kantiani, L.; Perez, S.; D. Barcelo (2008): Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC Trend in Analytical Chemistry* 27 (11): 991 – 1007.
- Galera-Laporta, L.; J. Garcia-Ojalvo (2020): Antithetic population response to antibiotics in a polybacterial community. *Sci. Adv.* 6: eaaz 5108.
- Gaze, W.; M. Depledge (2017): Antimicrobial resistance: Investigating the environmental dimension. *UN Environmental Frontiers Report: Emerging issues of environmental concern*: 12 – 20.
- Grote, M.; Schwake-Anduschus, C.; Michel, R.; Stevens, H.; Heyser, W.; Langenkämper, G.; Betsche, T.; M. Freitag (2007): Incorporation of veterinary antibiotics into crops from manured soil. *Landbauforschung Völkenrode* 57: 25 – 32.
- Gutierrez, I.R.; Watanabe, N.; Harter, T.; Glaser, B.; M. Radke (2010): Effect of sulfonamide antibiotics on microbial diversity and activity in a Californian Mollic Haploxeralf. *J Soil Sci Sedim* 10 (3): 537 – 544.
- Halling-Soerensen, B.; Nielsen, N.S.; Lanzky, P.F.; Ingerslev, F.; Holten Lützhöft, H.C.; S.E. Jörgensen (1998): Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review: *Chemosphere* 36 (2): 357 – 393.
- Hammesfahr, U.; Kotzerke, A.; Lamshöft, M.; B.-M. Wilke (2011): Effects of sulfadiazine-contaminated fresh and stored manure on a soil microbial community. *Europ J Soil Biol* 47: 61 – 68.
- Hamscher, G.; S.A.I. Mohring (2012): Veterinary drugs in soil and in the aquatic environment. *Chemie Ingenieur Technik* 12 (7): <https://doi.org/10.1002/cite.201100255>.
- Heberer, T.; Zühlke, S.; B. Fanck (2004): Arzneimittelrückstände in der aquatischen Umwelt. *LaborPraxis* 28 (3): 16 – 21.
- Jechalke, S.; Kopmann, C.; Rosendahl, I.; Groeneweg, J.; Weichelt, V.; Krögerrecklenfort, E.; Brandes, N.; Nordwig, M.; Ding, G.-C.; Siemens, J.; Heuer, H.; K. Smalla (2013): Increased abundance and transferability of resistance genes after field application of manure from sulfadiazine-treated pigs. *Appl Environ Microbiol* 79 (5): 1704 – 1711.
- Jechalke, S.; Heuer, H.; Siemens, J.; Amelung, W.; K. Smalla (2014): Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends Microbiol* 22 (9): 536 – 545.
- Jindal, A.K.; Brig, Y.S.M.; Pandya, K.M.; I.D.M. Khan (2015): Antimicrobial resistance: A public health challenge. *Med J Armed Forces India* 71 (2): 178 – 181.
- Jong, de J.; Bos, J.H.J.; de Vries, T.W.; L.T.W. de Jong-van den Berg (2014): Use of antibiotics in rural and urban regions in the Netherlands: an observational drug utilization study. *BMC Public Health* 14: 677.
- Kümmerer, K.; Al-Ahmad, A.; V. Mersch-Sundermann (2000): Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere* 40 (7): 701 – 710.
- Kümmerer, K. (2004): Resistance in the environment. *J Antimicrob Chemother* 54 (2): 311 – 320.
- Kümmerer, K. (2008): Pharmaceuticals in the environment – A brief summary. In: *Pharmaceuticals in the environment* (pp. 3 – 21).
- Kümmerer, K. (2010): Pharmaceuticals in the environment. *Annu Rev Environ Res* 35: 57 – 75.

- Leathers, T.D.; Rich, J.O.; Nunnally, M.S.; A.M. Anderson (2017): Inactivation of virginiamycin by *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol Lett* 40 (1): 157 – 163.
- Marshall, B.M.; S.B. Levy (2011): Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev* 24 (4): 718 – 733.
- Martinez, J.L. (2017): Effect of antibiotics on bacterial populations: a multi-hierarchical selection process. *F1000Research* 6: 1 – 10.
- Mitchell, S.M.; Ullman, J.L.; Bary, A.; Cogger, C.G.; Teel, A.L.; R.J. Watts (2015): Antibiotic degradation during thermophilic composting. *Water Air Soil Pollut* 226 (2): 13.
- Mogensen, A.S., J. Dolfing, F. Haagensen (2003): Potential for Anaerobic Conversion of Xenobiotics, *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 82, 64-134.
- Nicoloff, H.; D.I. Andersson (2016): Indirect resistance to several classes of antibiotics in cocultures with resistant bacteria expressing antibiotic-modifying or –degrading enzymes. *J Antimicrob Chemother* 71 (1): 100 – 110.
- NLWKN (2016): Niedersächsischer Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz: Tierarzneimittelstoffe im Grundwasser Niedersachsens, landesweite Bestandsaufnahme 1. Und 2. Halbjahr 2015. NLWKN-Betriebsstelle Hannover-Hildesheim (unveröff.).
- Oller, I.; Malato, S.; J.A. Sanchez-Perez (2011): Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for wastewater decontamination – A review. *Sci Tot Environ* 409: 4141 – 4166.
- Panseri, S.; D’Imporzano, G.; Pognani, M.; Cavalli, M.; F. Adani (2013): Effect of veterinary antibiotics on biogas and bio-methane production. *International Biodeterioration & Biodegradation* 85: 205 -209.
- Perez-Carrera, E.; Hansen, M.; Leon, V.M.; Björklund, E.; Krogh, K.A.; Halling-Sørensen, B.; Gonzalez-Mazo, E. (2010): Multiresidue method for the determination of 32 human and veterinary pharmaceuticals in soil and sediment by pressurized-liquid extraction and LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (3): 1173 – 1184.
- Pospiech, J.; Ullrich, M.; Göttling, S.; Truyen, U.; S. Speck (2014): Hygienisierung von Wirtschaftsdünger und Gärresten. *Schriftenreihe des LfULG Sachsen*, Heft 37.
- Ratsak, C.; Guhl, B.; Zühlke, S.; T. Delschen (2013): Veterinärantibiotikarückstände in Gülle und Gärresten aus Nordrhein-Westfalen. *Environ Sci Eur* 25 (1): 7.
- Reis, A.C.; Kolvenbach, B.A.; Nunes, O.C.; P.F.X. Corvini (2020): Biodegradation of antibiotics: The new resistance determinants – part I. Review article. *New Biotechnology* 54: 34 – 51.
- Reis, A.C.; Kolvenbach, B.A.; Nunes, O.C.; P.F.X. Corvini (2020): Biodegradation of antibiotics: The new resistance determinants – part II. Review article. *New Biotechnology* 54: 13 – 27.
- Schwake-Anduschus, C. (2009): Untersuchungen zur Aufnahme von Antibiotika durch Nutzpflanzen. *Dissertation, Universität Paderborn, Fakultät für Naturwissenschaften*.
- Selvam, A.; J.W.C. Wong (2017): Degradation of antibiotics in livestock manure during composting. In: *Current developments in Biotechnology and Bioengineering*, Eds. Wong, J.W.C.; Tyagi, R.D.; A. Pandey; Chapter 12: 267 – 292.
- Spielmeier, A. (2019): Out of sight, out of mind – Fate of antibiotics in manure. *Workshop Antibiotics in Manure and Digestate*, Weimar, January 10th – 11th.

- Sukul, P.; Lamshöft, M.; Zühlke, S.; M. Spiteller (2008): Photolysis of ¹⁴C-sulfadiazine in water and manure. *Chemosphere* 71 (4): 717 – 725.
- Taheran, M.; Naghdi, M.; Brar, S.K.; Knystautas, E.; Verma, M.; Surampalli, R.Y.; J.R. Valero (2016): Development of adsorptive membranes by confinement of activated biochar into electrospun nanofibers. *Beilstein J Nanotechnol* 7: 1556 – 1563.
- Teeter, J.S.; R.D. Meyerhoff (2003): Aerobic degradation of tylosin in cattle, chicken, and swine excreta. *Environ Res* 93 (1): 45 – 51.
- Ternes et al. (2017): Anthropogene Spurenstoffe, Krankheitserreger und Antibiotikaresistenzen im Wasserkreislauf. *TransRISK, BMBF; DWA Themen*.
- Thiele-Bruhn, S. (2003): Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *J Plant Nutr Soil Sci* 166 (2): 145 – 167.
- Thiele-Bruhn, S. (2019): Manure effects the fate of antibiotics in soil. *Workshop Antibiotics in Manure and Digestate, Weimar, January 10th – 11th*.
- Tolzin-Banasch, K.; Bähr, R.-P.; König, V.; Leiterer, M.; R. Riedel (2015): Entwicklung und Validierung neuer Analysenverfahren zur Charakterisierung und Qualitätssicherung landwirtschaftlicher Produktionsmittel und Produkte. *Arbeitspaket VI – Analytik und Bewertung von Tierarzneimittelrückständen in ausgewählten organischen Düngestoffen, Abschlussbericht, Jena*.
- UBA (2014): Antibiotika und Antiparasitika im Grundwasser unter Standorten mit hoher Viehbesatzdichte. *Umweltbundesamt Texte 27*.
- UBA (2018): Antibiotika und Antibiotikaresistenzen in der Umwelt. Hintergrund, Herausforderungen und Handlungsoptionen. *Umweltbundesamt, Für Mensch & Umwelt*.
- UBA (2019): Environmental risks from mixtures of antibiotic pharmaceuticals in soils – a literature review. *Final Report; Umweltbundesamt Texte 32*.
- Wang, L.; Zhong, D.; Chen, G.; Tang, F.; Song, Q.; J. Zhang (2013): Determination of antibiotic residues in manure by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid phase extraction. *Chinese Journal of Chromatography* 31 (10): 1010 – 1015.
- Westphal-Settele, K.; Konradi, S.; Balzer, F.; Schönfeld, J.; R. Schmithausen (2018): Die Umwelt als Reservoir für Antibiotikaresistenzen – ein wachsendes Problem für die öffentliche Gesundheit? *Bundesgesundheitsblatt* 61: 533.
- WHO (2015): World Health Organization. *Global action plan on antimicrobial resistance*.
- Woolhouse, M.E.; M. J. Ward (2013): Microbiology. Sources of antimicrobial resistance. *Science* 341 (6153): 1460 – 1461.
- Woolhouse, M.E.; Ward, M.J.; B. van Bunnik, J. Farrar (2015): Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.*, 370.
- Zhuang, Y.; Hongqiang, R.; Geng, J.; Zhang, Y.; Ding, L.; K. Xu (2015): Inactivation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater by chlorination, ultraviolet, and ozonation disinfection. *Environ Sci Pollut Res* 22: 7037 – 7044.
- Zühlke, S. (2019): Mass spectrometric analyses of antibiotic residues in manure and digestate. *Workshop Antibiotics in Manure and Digestate, Weimar, January 10th – 11th*.

Danksagung

Das Team von ABIOTEC möchte dem Thüringer Ministerium für Infrastruktur und Landwirtschaft (TMIL) und dem Projektträger Thüringer Aufbaubank (hier nach Richtlinie zur Förderung der Zusammenarbeit in der Land-, Forst- und Ernährungswirtschaft in Thüringen, LFE) für die großzügige Bereitstellung der finanziellen EU- und Landesmittel im Rahmen der Förderinitiative Ländliche Entwicklung in Thüringen, ELER, danken. In besonderer Weise gilt dies Frau Beetz und ihren MitarbeiterInnen, die stets geduldig und hilfsbereit den Projektverlauf begleiteten und unterstützten.

Ein besonderer Dank gilt der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft (ehemals TLL), insbesondere Frau Dr. Tolzin-Banasch für die stets sehr angenehme fachliche Begleitung, Förderung und Unterstützung. In diesem Zusammenhang sei auch ein großer Dank an Herrn Knappe, dem Gutachterausschuss sowie den Innovationsdienstleistern Frau Dr. Schütze und Herrn Hildebrandt für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung gerichtet.

Nicht zuletzt wollen wir uns in besonderer Weise bei dem im Projekt integrierten Agrarbetrieb MPG Milchproduktion Am Stadtberg GmbH & Co. Biogas KG unter Leitung von Herrn Reiter und seinen KollegInnen für die immer sehr freundliche, offene und zuverlässige Mitarbeit und Unterstützung bedanken.