

Abschlussbericht

**Nachhaltige umweltgerechte Nutzung von (stabilisierten)
urindominierten Substraten zur Produktion von Biomasse/NawaRo für die
energetische Nutzung und methodische analysen- und agrartechnische
Entwicklungen**

Kooperation AMEDITEC

2017 LFE 0002

Koordinator:

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

Agrargenossenschaft Diedorf/Eichsfeld e.G.
Gert Degenhardt, Dipl.-Ing. agr. Marcus Trost
Katharinenberger Str. 4
99988 Diedorf

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



Europäischer Landwirtschaftsfonds
für die Entwicklung des ländlichen Raums



Unterschrift:



Dr. E.-Peter Kulle
Projektleiter Kooperation AMEDITEC

Weimar, 25.06.2021

Zusammenfassung

In der modernen Tierhaltung werden neben klassischen Antibiotika auch nicht-antibiotische Wirkstoffe zum Schutz und zur Behandlung der Tiere therapeutisch eingesetzt. Bei der stofflichen Nutzung der Wirtschaftsdünger gelangen diese sowie deren Metaboliten und Transformationsprodukte auf die Böden und können die Kulturpflanzen, den Wasserkreislauf einschließlich des Grundwassers kontaminieren. Vielfältige Recherchen und Gespräche mit Landwirten und Veterinärmedizinerinnen zu den in der Praxis in Thüringen eingesetzten Tierarzneimitteln (TAM) wurden durchgeführt, um übliche Leitsubstanzen zu erfassen und systematisch zu klassifizieren.

Um zu einer ausreichend empfindlichen, robusten und matrixunabhängigen analytischen Methodik zu gelangen, wurden umfangreiche Entwicklungs- und Testarbeiten als notwendige Voraussetzung für den Nachweis des Abbaus dieser chemisch sehr heterogenen Wirkstoffe, ihrer Metaboliten und Transformationsprodukte in der komplexen und analytisch schwierigen Matrix Wirtschaftsdünger im Rahmen des Projektes AMEDITEC intensiv verfolgt. Hierzu war eine geeignete Probenvorbereitung essentiell, um bei vertretbarem, optimiertem Aufwand große Probenmengen hinsichtlich des breiten Spektrums an eingesetzten Präparaten untersuchen zu können.

Eine Bilanzierung der Stoffströme, z. B. bei Gülle-verwertenden Biogasanlagen, wird bei weiterer Kenntnis der Metaboliten und Transformationsprodukte zukünftig möglich. Begleitend zu den Abbauversuchen wurde eine praktikable 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 Wirtschaftsdüngern, die die Konzentrationen der Veterinärpharmaka und ihrer Abbauprodukte im Wirtschaftsdünger signifikant reduzieren, konnten im Labor- und kleintechnischen Maßstab identifiziert und entwickelt werden. In diesem Zusammenhang ist insbesondere auf die Bedeutung einer gezielten Strohvermischung, z. B. in Tretmistställen oder die unmittelbare Ausbringung der Wirtschaftsdünger auf das abgeerntete Stoppelfeld, so es Boden und Witterung zulassen, hinzuweisen. Die Basis für ein durch die landwirtschaftlichen Betriebe selbst technologisch und ökonomisch umsetzbares Verfahren zur Reduzierung der TAM, ihrer Metaboliten und Transformationsprodukte wurde gelegt. Im Rahmen aktueller Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen kann seine Umsetzung bzw. Überführung in den halb- und großtechnischen Maßstab erfolgen.

Praxisbezogene Hinweise und Orientierungshilfen zur Auswahl der Pharmaka, Strohvermischung und Lagerungsbedingungen, inklusive Reduzierung des Flüssiganteils und der daraus ableitbaren präferierten Ausbringung der Wirtschaftsdünger als Feststoff, konnten gegeben werden.

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

Inhalt

Zusammenfassung	3
Inhalt	4
Abkürzungsverzeichnis	7
Einleitung	9
Zielstellung	14
Material und Methoden	16
Theoretischer Teil	16
Recherchen	16
Recherchen zum Tierarzneimittleinsatz in der Praxis	16
Auswahl und Eigenschaften der Veterinärpharmaka	17
Albendazol	18
Antipyrin (Phenazon)	18
Cypermethrin	18
Diclofenac	18
Fenbendazol	19
Ivermectin	19
Monensin	19
Paracetamol	19
Phenylbutazon	20
Prednisolon	20
Tinidazol	20
Xylazin	20
3-Phenoxybenzoesäure	20
Oxfendazol	21
Interne Standards	22
Recherchen zu anbaurelevanten Energie- bzw. Rohstoffpflanzen	23
Überblick über die untersuchten Matrices	25
Verfahren der Analytik	25
Praktischer Teil	27
Entwicklung einer angepassten LC-MS-Methodik/Analytik	27
Aufbereitung, Ansatz, Extraktion, HPLC-MS-Methodik	27
Probenaufbereitung	27
Probenansatz	27
Probenextraktion	28
HPLC-Methode	28

MS-Methode – Optimierung der messspezifischen Einstellungen	29
Methodenvalidierung des Screeningverfahrens	30
Bestimmung der Wiederfindungsrate	30
Kalibrierung der Analysenmethode und Bestimmung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze	30
Agrobiotechnologische Verfahrensentwicklung und Abbauprobversuche	31
Untersuchungen zum Abbauverhalten - Kleinstgefäßversuche	31
Untersuchungen zum Abbauverhalten im labortechnischen Maßstab - Flaschenversuche	32
Untersuchungen zum Abbauverhalten - Feldversuche	33
Untersuchungen zum Abbauverhalten - Pflanzenversuche	34
Untersuchungen zum Abbauverhalten - Kleintechnische Versuche ‚Miststapel‘	34
Untersuchungen zum Abbauverhalten - Vererdung von Gärrest	35
Begleitende mikrobiologische Untersuchungen und Bewertungen	36
Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen	36
Ergebnisse und Diskussion	37
Validierung der Messmethode – Wiederfindungsraten, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	37
Abbauprobversuche in Kleinstgefäßversuchen	41
Labortechnische Abbauprobversuche - Flaschenversuche	42
Feldversuche	44
Standort AGD	44
Standort WH	45
Pflanzenversuche	47
Kleintechnische Versuche - ‚Miststapel‘	48
Vererdung von Gärrest	49
Mikrobiologische Untersuchungen	49
Laborversuche	50
Feldversuche	51
Säckchenproben aus Miststapelung	54
Rhizosphärenuntersuchung	55
Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen	57
Schlussfolgerungen und Ausblick	59
Literaturverzeichnis	64
Danksagung	70
Anhang	71
Abbauprobversuche in Kleinstgefäßversuchen	71
Labortechnische Abbauprobversuche – Flaschenversuche	71
Feldversuche	72

Standort AGD.....	72
Standort WH.....	73

Abkürzungsverzeichnis

3-PBA	3-Phenoxybenzoesäure
Abb.	Abbildung
BfT	Bundesverband für Tiergesundheit
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CAS	Chemical Abstracts Service
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
dot	dotiert
dt	Dezitonne
ELER	Europäischer Landwirtschaftsfonds für die Entwicklung des ländlichen Raums
EMA	European Medicines Agency
ESI	Electrospray-Ionisation
et al.	et alii (deutsch: und andere)
EU	European Union
FKZ	Förderkennzeichen
FNR	Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GKZ	Gesamtkeimzahl
GR	Gärrest
h	Stunde
ha	Hektar
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitchromatographie)
HTK	Hühnertrockenkot
IBKE	Institut für Biogas, Kreislaufwirtschaft und Energie
IS	interner Standard
IUML	Institut für Umweltmedizin, Labor
kg	Kilogramm
L	Liter
LC	Liquid chromatography (Flüssigkeitchromatographie)
LFE	Förderung der Zusammenarbeit in der Land-, Forst- und Ernährungswirtschaft
LOD	limit of detection (deutsch: Nachweisgrenze)
LOQ	limit of quantitation (deutsch: Bestimmungsgrenze)
m	Meter
m ²	Quadratmeter
m ³	Kubikmeter
MFPA	Materialforschungs- und -prüfanstalt
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
Mio.	Millionen
mL	Milliliter

MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie/Massenspektrometer
n	Anzahl
NawaRo	nachwachsende Rohstoffe
Rcf	relative centrifugal force
RiMi	Rindermist
RiGR	Rindergärrest
RiGü	Rindergülle
RP	Umkehrphase
SG	Schweinegülle
S / Str	Stroh
TAB	Thüringer Aufbaubank
Tab.	Tabelle
TAM	Tierarzneimittel
TAR	Tierarzneimittelregister Deutschland
TLLLR	Thüringer Landesamt für Landwirtschaft und Ländlichen Raum
TLV	Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz
TM	Trockenmasse
TMIL	Thüringer Ministerium für Infrastruktur und Landwirtschaft
UBA	Umweltbundesamt
undot	undotiert
VDLUFA	Verband deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten
v/v	Volumenprozent
WFR	Wiederfindungsrate
WHO	World Health Organization

Einleitung

Der Verbleib von Tierarzneimittelrückständen aus tierischen Ausscheidungen nach Lagerung, Behandlung, und Ausbringung in die Umwelt ist seit vielen Jahren Ausgangspunkt intensiver und kontroverser Diskussionen (Abb. 1). Dabei sind zahlreiche Fragen wie beispielsweise das Auftreten und Verhalten der Substanzen in den verschiedenen Umweltkompartimenten selbst, aber auch ihrer Metaboliten und Transformationsprodukte, der Verbleib der Wirkstoffe sowie ihr Abbau offen. Insbesondere auch Veterinärmedikamente jenseits der klassischen Antibiotika wie *Antiphlogistika* (Schmerz- und Entzündungshemmer), *Antiparasitika* (Kokkzidiostatika, Anthelmintika, Insektizide) und *Hormone* (Gestagene, Prostaglandine, Releasinghormone) zur Fruchtbarkeits- und Geburtssteuerung stehen im Mittelpunkt der Betrachtungen und Debatten. In diesem Zusammenhang ist auch eine Versachlichung des Themas wünschenswert und geboten.

Haupteintragspfade von Tierarzneimitteln in die Umwelt

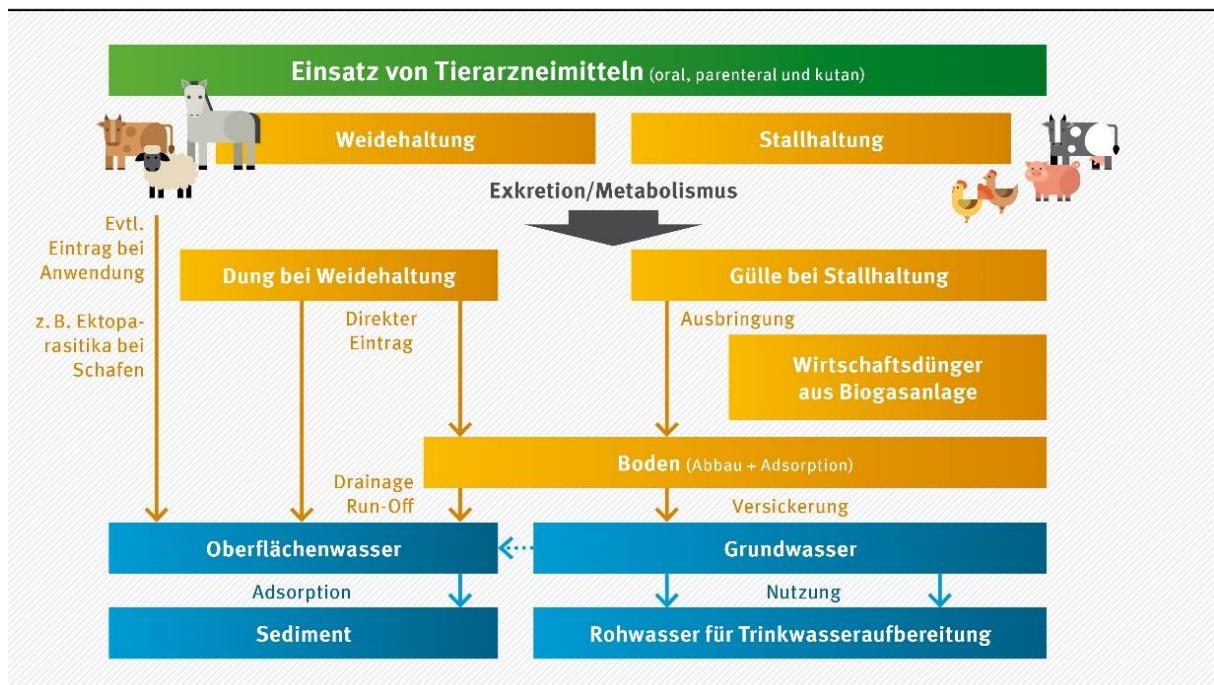


Abbildung 1: Eintragungspfade von Tierarzneimitteln in die Umwelt (UBA, 2017)

In Deutschland lässt sich der Einsatz von Tierarzneimitteln (TAM) anhand der jährlichen Übersicht zur Umsatzerhebung des Bundesverbandes für Tiergesundheit (BfT) abschätzen (Abb. 2). Hier erfolgt eine Klassifizierung in Impfstoffe und Seren für die Immunabwehr (Biologika), Therapeutika gegen Infektionskrankheiten (Antiinfektiva), Präparate gegen Parasitosen (Antiparasitika) und pharmazeutische Spezialitäten (Antiphlogistika, Analgetika, Antipyretika, Antiarrhythmika, etc.). Im betrachteten Zeitraum stieg der Umsatz für TAM von 509 Mio. Euro im Jahr 2003 auf 878 Mio. Euro im Jahr 2020, was hauptsächlich auf ansteigende Tierbestandszahlen zurückzuführen ist. Während die Gruppen der Biologika und Antiparasitika ein gleichbleibendes Niveau verzeichnen, ist bei der Entwicklung der Antiinfektiva und spezifischen Pharmaka eine gegenläufige Tendenz zu erkennen. Im Hinblick auf absolute Verbrauchsmengen liegen, aufgrund schwer zugänglicher Rohdaten, konkrete Zahlen meist nur im Bereich der Antiinfektiva vor. Die Einsatzmengen klassischer Veterinärantibiotika sind in den zurückliegenden 15 Jahren stark rückläufig.

Die tierischen Ausscheidungen an nährstoff- und umweltrelevanten Stickstoff, Phosphor und Veterinärpharmaka liegen in Agrarbetrieben hauptsächlich im Urinanteil der Gülle. Damit kommt der Flüssigphase der Wirtschaftsdünger eine besondere und entscheidende Bedeutung zu.

Eine sichere Ausbringung und Verwendung (und ggf. Reduzierung) derartiger Problem- und Spurenstoffe ist aus emissions- und immissionsbezogenen Gründen im Rahmen der politischen Machbarkeit aktuell geboten. Bei der stofflichen Nutzung urindominierter Substrate können die enthaltenen Wirkstoffe sowie deren Metaboliten ggf. im Boden und in der Pflanze akkumulieren oder in den Wasserkreislauf also auch in das Grundwasser gelangen (Abb. 3).

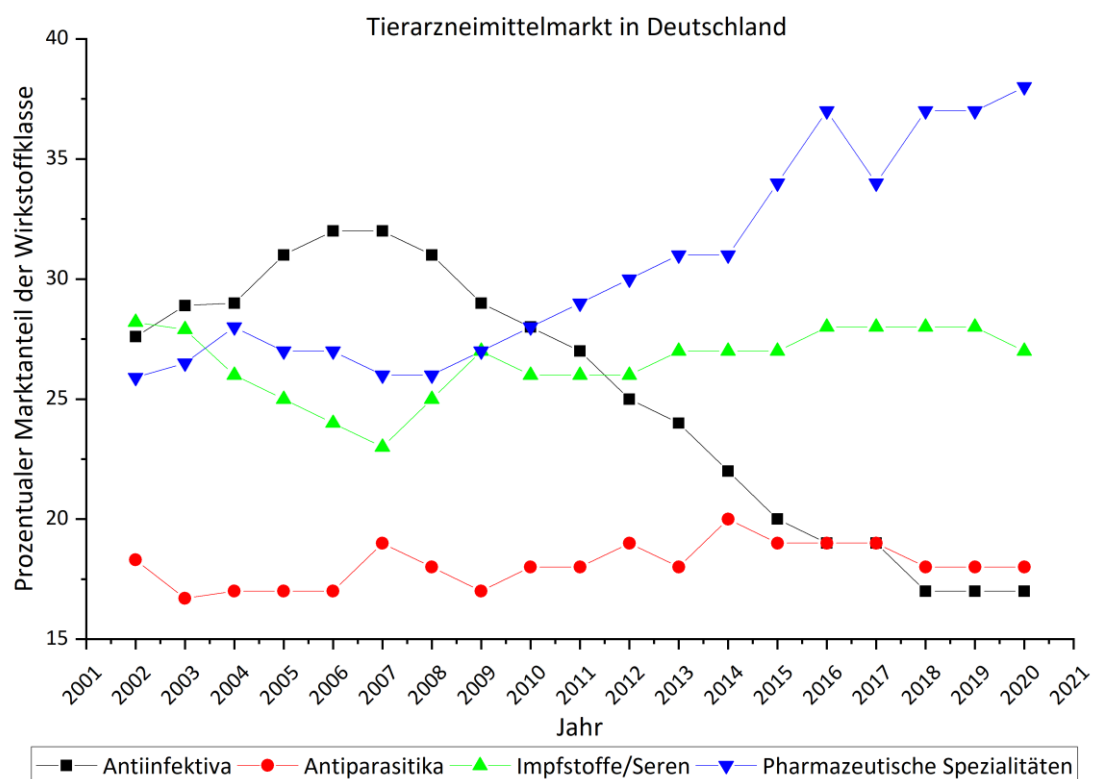


Abbildung 2: Übersicht zu Marktanteilen von Tierarzneimitteln in Deutschland nach BfT (Bundesverband für Tiergesundheit, 2003-2020)

Auf insgesamt etwa einem Fünftel der deutschen Ackerfläche werden nachwachsende Rohstoffe angebaut. Perspektivisch sieht die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR) Anbaupotenziale für Energie- und Industriepflanzen auf bis zu 4 Mio. Hektar Ackerfläche ohne die Versorgung mit Nahrungsmitteln zu beeinträchtigen und ohne Naturschutzaspekte außer Acht zu lassen. Die mit Abstand wichtigste Nutzungsrichtung ist der Anbau von Energiepflanzen. Energieträger aus der heimischen Land- und Forstwirtschaft stellen den weitaus größten Anteil erneuerbarer Energien. So haben sich Biogasanlagen mittlerweile - auch vor dem Hintergrund jahrelang niedriger Milch- und Fleischpreise - zu einem wichtigen Standbein vieler Agrarbetriebe entwickelt.

Der Anbau von Energiepflanzen hat nach hohen Steigerungsraten zurückliegender Jahre ein Plateau erreicht. In jüngster Zeit werden immer wieder öffentlich geäußerte Kritiken gegenüber der Landwirtschaft hinsichtlich des Düngemiteleinsatzes, insbesondere beim „reaktiven Stickstoff“, laut. So wurde Deutschland von Seiten der EU wegen mangelnden Grundwasserschutzes (steigende Nitratwerte) verklagt. Auch an dieser Stelle ist eine Versachlichung der Situation geboten.

Den Mineraldüngereinsatz haben Deutschlands Landwirte im vergangenen Wirtschaftsjahr spürbar eingeschränkt. Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes wurden bezogen auf den Gehalt an Reinnährstoff 2015/16 insgesamt etwa 2,4 Mio. t an stickstoff-, phosphat- und kalihaltigen Düngemitteln und damit 184.500 t (7 %) weniger als im Vorjahr eingesetzt. Dennoch sind Ammoniakbelastungen durch intensive Tierhaltung sowie ggf. auffällige Nitratgehalte im Grundwasser immer wieder in der öffentlich-politischen Diskussion.

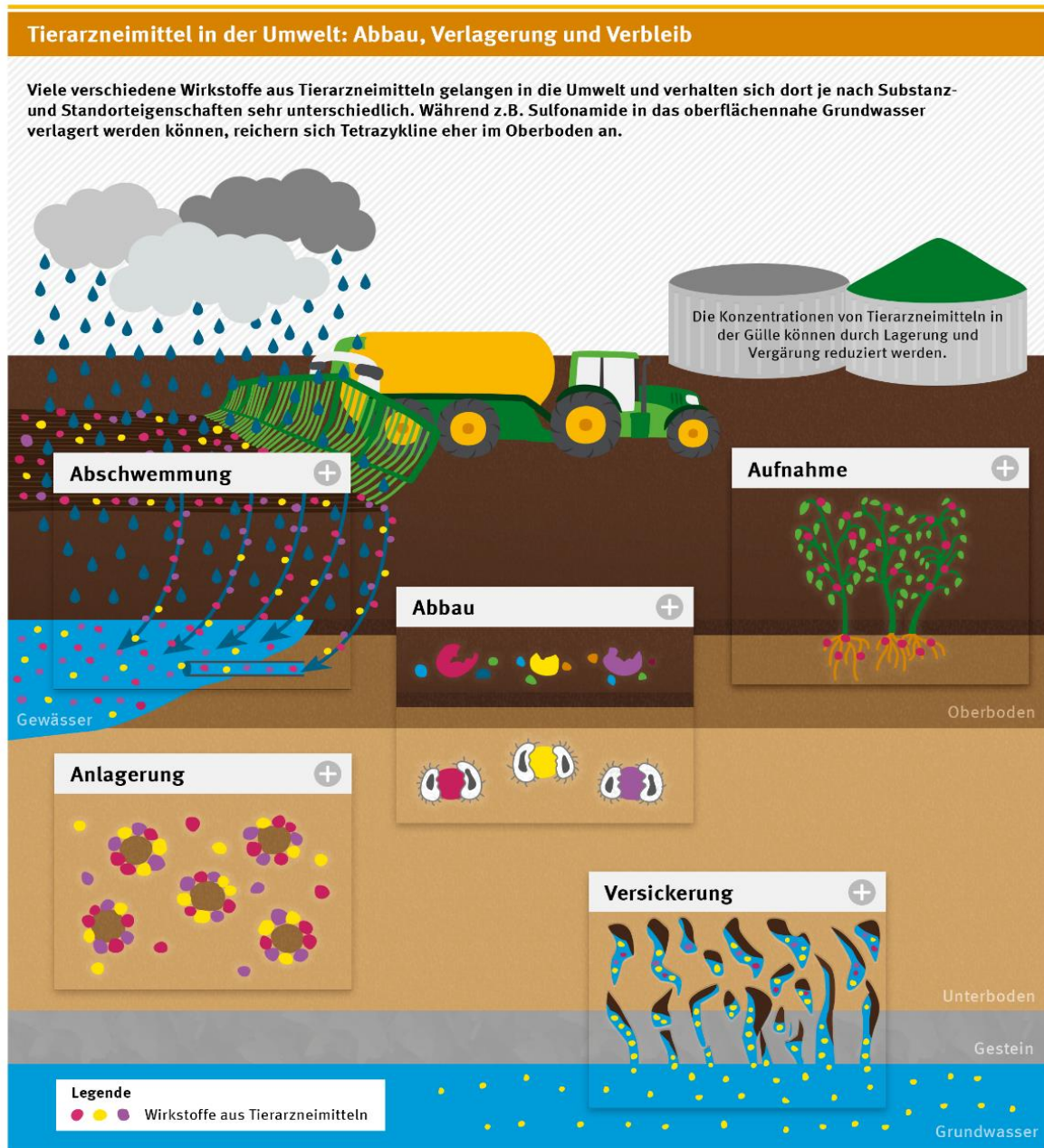


Abbildung 3: Verhalten von Tierarzneimitteln in der Umwelt (UBA, 2017)

Die optimale Ernährung pflanzlicher Kulturen, die Erhaltung einer stabilen Bodenfruchtbarkeit, die Verhinderung von Bodenerosion und -degeneration sind zentrale Anliegen kleiner bäuerlicher wie auch moderner, industriell ausgerichteter, landwirtschaftlicher, Gartenbau- und forstwirtschaftlicher Betriebe. Sie sind existenziell, um den Fortbestand der Unternehmen mittel- und langfristig zu sichern.

Vor wenigen Jahren hat das Bundeskabinett die Reform der Düngeverordnung beschlossen. Der Agrarausschuss des Bundestages hat zudem für die Novelle des Düngegesetzes gestimmt. Damit sind höhere Ansprüche an die Nährstoffeffizienz bei der Düngung mit Gülle und Gärresten sowie die zeitlichen Abläufe beim Ausbringen – bei zunehmend engerem Ausbringungsfenster - gestellt.

Mit dem gemeinsamen Projekt wollen sich die beteiligten Agrarbetriebe den Ansprüchen einer gezielteren Düngung und Weiterentwicklung eines emissionsarmen betriebskonformen Ausbringungsprozedere stellen. Dabei spielen Überlegungen zur Fahrgassenoptimierung, einer Zwischenlagerung des Flüssigdüngers am Ackerrand in Verbindung mit bodenschonender Ausbringungstechnik sowie eine Reduzierung des Wasseranteils durch angepasste Vererdungsprozesse eine Rolle.

Die Förderinitiative „Verminderung von Stickstoffemissionen“ der Deutschen Bundesstiftung Umwelt/ Umweltbundesamt (UBA) sieht im Rahmen der Versachlichung des Themas Bedarf bei der Optimierung des Stickstoffmanagements. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) und das UBA formulierten im Rahmen verschiedener, sehr aktueller Studien und Projekte hinsichtlich der Pharmaka bzw. Arzneimittelrückstände unbedingte Handlungsnotwendigkeiten (*Bergmann et al. 2011; Hannappel et al. 2014a; Kemper et al. 2018*).

Damit sollte das Projekt AMEDITEC einerseits an das bereits laufende Vorhaben ABIOTEC sachbezogen und weiterführend anknüpfen und andererseits um die Aspekte nachwachsende Rohstoffe, Veterinärmedikamente/nicht-antibiotische Pharmaka und deren Analytik (in Boden und Pflanze), den Aspekt Nährstoffe, Agrartechnik und Separation behandelter Tiere ergänzt werden, und sich in dieser Weise klar abgrenzen. Eine enge Zusammenarbeit und Abstimmung mit dem Thüringer Landesamt für Landwirtschaft und Ländlichen Raum (TLLLR) wurde angestrebt. Das Projekt verfolgte das Ziel, zu einer Versachlichung des politisch brisanten Themas beizutragen.

Der zentralen Frage nach Verbleib und Gefährdungspotenzial (u.a. Toxizitäten) durch Anreicherung und Transformation beim Einsatz von TAM wird bislang nur unzureichend Rechnung getragen und verlangt nach weiterführender Forschung (Abb. 4). Veterinärpharmaka verbleiben nur zu einem geringen Anteil im Organismus und werden größtenteils (60 bis 80 %) wieder ausgeschieden. Neben Ab- und Umbauprozessen erfolgt ein Transport hauptsächlich in sorbierter oder gelöster Form. Es kommt zum Übergang der Wirkstoffe in die Ausscheidungsprodukte und damit zur Anreicherung in Wirtschaftsdüngern. Die Tierarzneimittel, sowie deren Metaboliten und Transformationsprodukte, gelangen direkt (in Form von Exkrementen) oder indirekt über Gärreste aus Biogasanlagen auf Böden und über Auswaschungen ins Grundwasser. Eine besonders hohe Belastung weisen auf diesem Verteilungsweg die Wirtschaftsdünger auf (*Hamscher und Mohring 2012*).

Unter Wirtschaftsdüngern werden alle tierischen (Jauche, Gülle, Festmist) und pflanzlichen (Stroh, Futterreste, Mulch) Substrate sowie Gärrückstände aus Biogasanlagen zusammengefasst, die in der Landwirtschaft zur Rückführung von organischer Materie in den Boden eingesetzt werden. Die Folgen der Freisetzung von TAM über Dünger sind vielfältig und geben Anlass zu weiterem Forschungsbedarf. Neben vielfältigen ökotoxikologischen Auswirkungen auf Wasser- und Bodenorganismen, werden vor allem die Qualität von Grund- und Oberflächenwasser sowie landwirtschaftlich genutzter Böden beeinträchtigt.

Effekte von Arzneimitteln auf Nichtzielorganismen

Kurzübersicht über in Studien beobachtete Effekte von Arzneimittelwirkstoffen, die u.a. im Rahmen der Tierarzneimittelzulassung eingereicht und bewertet wurden (Stand 2017).

Nichtzielorganismen	Effekt im Laborversuch	Wirkstoffe
 Wasserflöhe	 geringe toxische Wirkung	Sulfadimethoxin, Sulfamethoxazol, Sulfadimidin, Trimethoprim
	 starke toxische Wirkung	Closantel, Cypermethrin, Deltamethrin, Doramectin, Eprinomectin, Fenbendazol, Flubendazol
 Zuckmücken	 starke toxische Wirkung	Deltamethrin
 Fische	 starke toxische Wirkung	Altrenogest, Closantel, Cypermethrin, Deltamethrin, Eprinomectin, Ivermectin
 Regenwürmer	 mäßig toxische Wirkung	Closantel, Cypermethrin, Deltamethrin, Eprinomectin, Ivermectin
 Organismen im Dung, wirbellose Dunglarven	 mäßig toxische Wirkung	Closantel
	 starke toxische Wirkung	Cypermethrin, Deltamethrin, Doramectin, Eprinomectin, Ivermectin
 Bodenorganismen	 Verminderte Bodenphosphataseaktivität	Doxyzyklin
	 Änderung der Bakteriengemeinschaft	Lincomycin, Sulfadiazin
 Wasserpflanzen	 geringe Wachstumshemmung	Trimethoprim
	 starke Wachstumshemmung	Florfenicol
 Nutzpflanzen	 mäßige Keimhemmung	Sulfamethoxazol
	 starke Keimhemmung	Florfenicol
	 mäßige Wachstumshemmung	Enrofloxacin, Sulfadiazin
	 starke Wachstumshemmung	Enrofloxacin, Florfenicol
 Cyanobakterien	 geringe Wachstumshemmung	Trimethoprim
	 mäßige Wachstumshemmung	Amoxicillin/Penicillin Säure, Tetrazyklin
	 starke Wachstumshemmung	Enrofloxacin, Erythromycin, Oxytetracyclin
 Grünalgen	 keine Wachstumshemmung	Amoxicillin/Penicillin Säure
	 mäßige Wachstumshemmung	Enrofloxacin, Ivermectin, Tetrazyklin
	 starke Wachstumshemmung	Erythromycin

  toxische Wirkung
  Verschiebung der Artenzusammensetzung
   Wachstumshemmung

Abbildung 4: Umweltrelevante Effekte von Tierarzneimitteln auf Nichtzielorganismen (UBA, 2017)

Über den Eintrag in die Umweltkompartimente resultiert folglich eine direkte Einwirkung für die menschliche Gesundheit (Hamscher 2008). Der gestiegene Einsatz pharmazeutisch-spezialisierter Pharmaka in der Intensivtierhaltung und der direkte Einfluss auf Umwelt und Gesundheit des Menschen zeigt die umweltpolitische Brisanz der Thematik und bildet die Grundlage des Projekts. Der Anstieg des Einsatzes von spezialisierten TAM und der Umstand, dass es keine genormte analytische Methode für die Untersuchung dieser Wirkstoffe in Wirtschaftsdüngeramalgamaten gibt, rückt die Analytik dieser heterogenen Substanzklassen ins Zentrum der Untersuchungen.

Zielstellung

Wesentliche Zielstellung des Projekts war die Entwicklung eines analytischen Verfahrens zur sicheren qualitativen und quantitativen Bestimmung von nicht-antibiotischen Veterinärpharmaka in Wirtschaftsdüngern. Die zu etablierende Methodik sollte als Voraussetzung für den Nachweis des Ab- und Umbaus von TAM in verschiedenen Düngermatrices dienen. Mit ihr sollte ermöglicht werden, verfahrenstechnische und praxisnahe Ansätze für agrobiotechnologische Behandlungsstufen zu identifizieren, welche die TAM-Konzentrationen reduzieren können. Methodisch-analytisch war das Verhalten von ausgewählten TAM in unterschiedlichen Düngermatrices zu untersuchen und zu bewerten.

Eine praktikable Stabilisierung urindominierter Substrate und der einhergehende weitgehende Abbau problematischer Spurenstoffe waren wichtige Aspekte des angewandten Forschungsprojektes. Die damit verbundene Vermeidung von Nährstoffverlusten und Hygienisierungsproblemen in Zusammenhang mit der Lagerung und Ausbringung jener Substrate waren dabei wesentliche betriebsrelevante Aspekte. Das spätere Stabilisierungsverfahren sollte praktikabel, kostengünstig und von den Betrieben selbst umsetz- und betreibbar sein. Die Reduzierung von Emission und Immission umwelt- und hygienerelevanter Noxen spielte innerhalb des Projektes eine entscheidende Rolle. Damit war ein erheblicher Beitrag zur Umweltentlastung und nachhaltigen Produktion der Agrarbetriebe verbunden. Mit dem Projekt sollte eine sichere analytische Methodik für die Bestimmung von Spurenstoffen, deren Metaboliten und Transformationsprodukten im Substrat, in Boden- und Pflanzenmaterial begleitend weiterentwickelt werden. Die sichere Analytik als notwendige Voraussetzung für den Nachweis des Abbaus dieser Substanzen im Rahmen einer nachhaltigen Ressourcenverwendung konnte im Labormaßstab vorbereitet und erprobt und im Praxisbetrieb auf Kulturparzellen geprüft werden.

Das Forschungsprojekt war darauf ausgerichtet, relevante Spurenstoffe der Substrate soweit zu reduzieren, dass einerseits die Umweltgüter Wasser, Boden und Luft geschützt und andererseits die Wertstoffe dauerhaft verwertet werden können. Dabei sollte die gezielte Nutzung des Rhizosphären-effekts typischer Energie- und Rohstoffpflanzen und dessen Förderung ein innovativer Aspekt des Forschungsansatzes darstellen (Abb. 5).

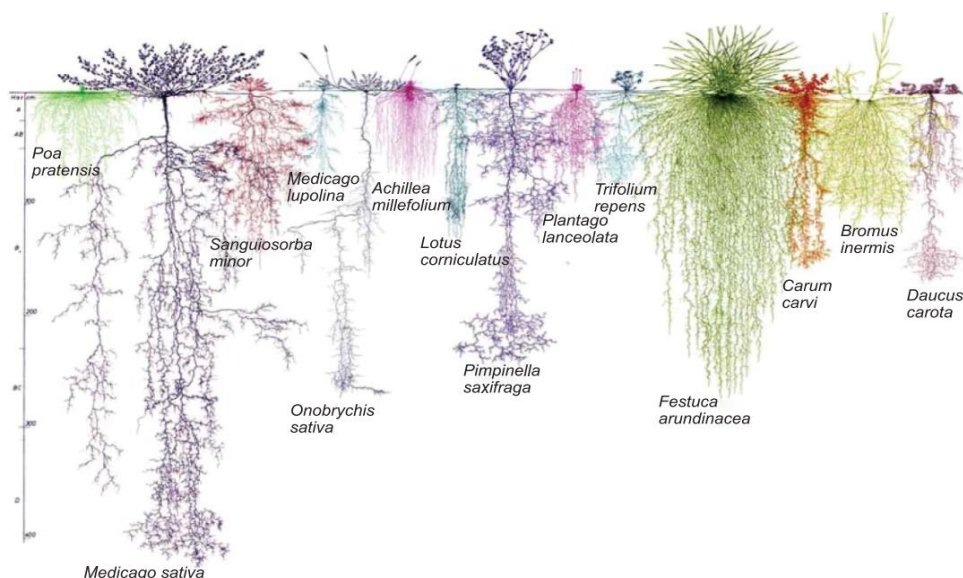


Figure 1. Root distribution pattern of species used in grass-clover mixture FM (4 m depth). Root pictures of the crops created after Kutschera and Lichtenegger (1982, 1992).

Abbildung 5: Ausgeprägte Wurzelsysteme einer Kleeegrasmischung (Braun et al. 2010)

Das Forschungsprojekt hatte daher auch Untersuchungen des Abbaus der TAM bei der Ausbringung der Wirtschaftsdünger, der Tauglichkeit des Einsatzes tierischer, urindominierter Substrate als direkter Flüssigdünger für Energie- und Rohstoffpflanzen zum Gegenstand. Dabei sollten weitgehend optimale Beschickungsmengen für das beste Pflanzenwachstum ermittelt und andererseits der Nachweis der Unbedenklichkeit für die Umwelt allgemein und das (Grund-)Wasser geführt werden. Potentiell gefährdende Stoffe im urinhaltigen Substrat sind Arzneimittelreste und pathogene Keime.

Zum Abbau dieser Verunreinigungen und potentiell gefährlichen Stoffe waren einerseits deren Reduzierung, Ab- und Umbau während der Lagerung und andererseits während der Bodenpassage bzw. des Bodenaufenthalts nachzuweisen. Gleichzeitig sollte die (mikrobiologische) Unbedenklichkeit bewertet werden. Agrarbetriebe würden direkt durch einen rückstandssicheren Nachbau von Lebens- und Futtermittelpflanzen profitieren.

Naheliegender ist der Einsatz zur Erzeugung von nachwachsenden Rohstoffen (NawaRo), insbesondere Biomasse (Energiepflanzen) im Bereich der Biogasanlagen bzw. mit nachfolgender thermischer Verwertung. Nach jetzigem Kenntnisstand sind folgende Randbedingungen von Bedeutung, zu deren Klärung das Projekt anteilig einen konkreten, wenn auch begrenzten Beitrag leisten konnte:

- Zusammensetzung der urindominierten Substrate (Gärrest)
- Optimaler Zeitraum der Zwischenlagerung
- Aufbringmengen
- Nachweis des Gehalts von Spurenstoffen im Boden, Anreicherung in Boden und Pflanzen
- Praktikable Handlungsempfehlungen für die betriebliche und langfristige wirtschaftliche Anwendung
- Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen

Die im Rahmen des Projekts durchzuführenden Versuche sollten unter definierten Bedingungen mittels dotierter Matrices durchgeführt werden. Bei Medikamenten ohne bekannten detaillierten Metabolismus können nur die Wirkstoffkonzentrationen der jeweiligen Substanz im Input und Output betrachtet werden, d.h. ohne Transformationsprodukte. Dies trifft auf nahezu alle Wirkstoffe zu. Des Weiteren war die Entwicklung einer Prüfroutine zur Beurteilung von bodenbiologischen und mikrobiologisch-hygienischen Effekten der urindominierten Substrate und der behandelten Böden ein wichtiger Aspekt des Projekts.

Mit dem Projekt sollten den Agrarbetrieben und Veterinärmedizinern, aber auch der fach- und sachbegleitenden Verwaltung konkrete und im Realbetrieb umsetzbare Vorschläge und Hinweise zur Auswahl und zum Einsatz von TAM und in diesem Zusammenhang zur sicheren und weitestgehend optimalen Handhabung der Wirtschaftsdünger gegeben werden.

Material und Methoden

Theoretischer Teil

Recherchen

Ausgangspunkt des umfangreichen Forschungsprojekts waren einerseits intensive Recherchen zu den in der landwirtschaftlichen Praxis real eingesetzten nicht-antibiotischen Pharmaka als auch wichtigen relevanten Energie- und Rohstoffpflanzen (NawaRo). Sowohl aktuelle Veröffentlichungen seitens des Bundes und seiner Behörden, Gespräche im Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz (TLV), wie auch (internationale) Fachpublikationen zu analytischen Methoden, dem tierspezifischen Einsatz der relevanten Veterinärpharmaka, ihres Verhaltens in den verschiedenen Umweltkompartimenten einschließlich ihrer Toxikologie wurden 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 nicht-antibiotischen Veterinärpharmaka in Thüringen zu erhalten. Andererseits hatte sich das TLLR (als TLL) in den zurückliegenden Jahren intensiv mit nachwachsenden Rohstoffen und Energiepflanzen beschäftigt.

Recherchen zum Tierarzneimiteleinsatz in der Praxis

In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse aus den persönlichen Befragungen und Recherchen zum Einsatz von nicht-antibiotischen Veterinärpharmaka in der Praxis dargestellt (Tab. 1). Dabei wurde der veterinärmedizinische Einsatz der Pharmaka innerhalb der Nutztier- oder Haustiergruppen zusammenfassend betrachtet.

Tabelle 1: Im Veterinärbereich relevante, nicht-antibiotische Pharmaka nach Recherche

Benzimidazole			
Albendazol	Ketotriclabendazol	Oxfendazol-sulfon	Praziquantel
Albendazolsulfon	Levamisol	Oxibendazol	Rafoxanid
Albendazol-2-aminosulfon	Mebendazol	Triclabendazolsulfoxid	Morantel
Albendazolsulfoxid	Thiabendazol	Netobimin	Niclosamid
Aminoflubendazol	Triclabendazol	Febantel	Pyrantel
Aminomebendazol	Triclabendazol sulfon	Clorsulon	Aminooxibendazol
Flubendazol	Fenbendazol	Closantel	Ciclobendazol
5-Hydroxy-Thiabendazol	Fenbendazol	Nitroxinil	Fenbendazolamin
Hydroxymebendazol	Oxfendazol	Oxyclozanid	Hydroxyflubendazol
			4-Hydroxy-tetramisol
Kokzidiostatika	Sedativa	saure NSAIDs	basische NSAIDs
Amprolium	Acepromazin	Carprofen	Paracetamol
Arprinocid	Azaperon	Diclofenac	Acetylamino-Antipyrin
Clazuril	Carazolol	Flufenaminsäure	Formylamino-Antipyrin

Tabelle 1: Fortsetzung

Decoquinat	Chlorprothixene	Flunixin	Methylamino-Antipyrin
Diclazuril	Methapyrilen	5-Hydroxyflunixin	Aminoantipyrin (Aminophenazon)
Dinitolmid DOT	Promethazin	Ibuprofen	Isopyrin (Ramifenazon)
Ethopabat	Propionylpromazin	Mefenaminsäure	Antipyrin/Phenazon
Halofuginon	Chlorpromazin	Ketoprofen	Hydroxy-Antipyrin
Lasalocid	Xylazin	Meloxicam	Propyphenazon
Maduramicin	Azaperol	Naproxen	Firocoxib
Meticlorpindol, Clopidol	Azaperon	Niflumininsäure	Metamizol
Narasin, 4-Methylsalinomycin	Triflupromazin Fluoprom.	Oxyphenbutazon Monohydrat	Dimethyl-aminoantipyrin
Monensin	Haloperidol	Phenylbutazon	Aminopropylon
Dinitrocarbanilid (DNC)	Ketamin	Pyrethroide	Nicotin
Robenidin	Kortikosteroide	Cypermethrin	Cotinin (Metabolit)
Salinomycin	Betamethason	Deltamethrin	Nikotin
Semduramicin	Dexamethason	Permethrin, Gesamt-	Avermectine
Tinidazol	Flumethason	Bifenthrin	Doramectin
Toltrazuril	Methylprednisolon	Cyfluthrin, Gesamt-	Ivermectin
Toltrazurilsulfon	Prednisolon	Fenvalerat Esfenvalerat	Eprinomectin B1a
Toltrazurilsulfoxid	Triamcinolon	Lambda-Cyhalothrin,	Moxidectin
			Avermectin B 1 a

Die in *Tabelle 1* aufgelisteten Wirkstoffe wurden als praxisrelevante Vertreter der wichtigsten Wirkstoffklassen unter den Aspekten ihrer Einsatzrelevanz und Kosten für die Abbauprobe ausgewählt. Die Wirkstoffe repräsentieren die große Vielfalt der nicht-antibiotischen veterinärmedizinischen Pharmaka. Sie wurden in den verwendeten Dotierlösungen eingesetzt.

Auswahl und Eigenschaften der Veterinärpharmaka

Für die Entwicklung und Etablierung der analytischen Methode zur Untersuchung des Abbauverhaltens von Veterinärpharmaka wurden insgesamt 14 Substanzen ausgewählt. Das Abdecken eines breiten Wirkungsspektrums, die Relevanz für den Einsatz in der industriellen Tierhaltung sowie die Möglichkeiten der analytischen Methodik waren dabei maßgeblich für die Auswahl der Arzneistoffe. Die Grundlage für die Methodenentwicklung bildeten die Erkenntnisse aus vorangegangenen Untersuchungen zur Substanzklasse der Antibiotika in Wirtschaftsdüngern.

Die Zielsetzung bestand darin, zusätzlich zu antibiotischen Antiinfektiva den Fokus auf Vertreter aus anderen therapeutisch angewendeten Substanzklassen zu setzen. Weiterhin war die Bestrebung, ein analytisches Verfahren zu entwickeln, das Vertreter unterschiedlicher Wirkstoffklassen detektiert und den Prozess des Abbaus bzw. der Umwandlung erfasst. Zur Untersuchung wurden Substanzen aus den Klassen Analgetika, Antipyretika, Antiphlogistika und Antiparasitika (Anthelmintika, Endo- und Ektoinsektizide) herangezogen.

Zusätzlich wurden zwei charakteristische Metaboliten in die Methodik aufgenommen, da diese Rückschlüsse auf das Abbauverhalten der Ausgangssubstanz ermöglichen. Die ausgewählten Vertreter dieser Klassen zeichnen sich durch eine sehr heterogene chemische Struktur sowie Wirkweise aus. Nachfolgend werden die Substanzen kurz charakterisiert und ihre chemischen Eigenschaften tabellarisch zusammengefasst (Tab. 2).

Albendazol

Albendazol ist ein Benzimidazolcarbamat mit einer breiten anthelmintischen Wirkung. Aufgrund seiner starken Hydrophobizität wird es schlecht aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert (*Rathod et al. 2016*). Typischerweise erfolgt eine schnelle Metabolisierung in Form von Oxidation zum Albendazolsulfoxid in der Leber, was als First-Pass-Effekt bezeichnet wird. Hierbei wird die schlechte Bioverfügbarkeit umgewandelt und die pharmakologisch aktive Form gebildet (*Dayan 2003*).

Antipyrin (Phenazon)

Phenazon ist ein nichtsteroidales Antiphlogistikum mit schmerz- und entzündungshemmenden Eigenschaften. Der zur Gruppe der Pyrazolone gehörende Wirkstoff stellt die synthetische Grundlage für heute gebräuchlichere Medikamente (Metamizol) dar (*Costa et al. 2006*). Aufgrund verschiedener Nebenwirkungen findet es vornehmlich Anwendung in der Veterinärmedizin und unterliegt somit einer Kontrolle zum Schutz vor potentiellen Anreicherungen bei der Erzeugung tierischer Lebensmittel (*Park et al. 2015*).

Cypermethrin

Cypermethrin ist ein Insektizid aus der Gruppe der Pyrethroide. Diese sind strukturell betrachtet synthetische Pyrethrin-Derivate. Cypermethrin zeichnet sich, wie alle Pyrethroide, durch seine erhöhte Wirkdauer, Langlebigkeit und Photostabilität im Vergleich zu natürlichen Verbindungen aus. Neben seiner Wirkung als Kontakttoxin wirkt es zusätzlich repellierend für Parasiten (*Nolan et al. 1979*). Aufgrund des breiten Wirkspektrums findet Cypermethrin neben dem Einsatz in der Nutztierhaltung (Rind, Schwein, Geflügel, Fisch) auch Anwendung als Biozid in der Holzindustrie sowie als Pflanzenschutzmittel (*Naumann et al. 1990*).

Diclofenac

Diclofenac ist ein nichtsteroidales Antirheumatikum mit analgetischer, antipyretischer und antiphlogistischer Wirkung. In der Europäischen Union (EU) ist das Medikament seit 2014 für die Veterinärmedizin zugelassen. Aufgrund des hohen Einsatzes in Human- und Veterinärmedizin steht Diclofenac auf der EU-Liste der prioritär zu überwachenden Stoffe und gilt als „chemical of emerging concern“ (*Jewell et al. 2016*). Es ist somit ein Wirkstoff mit potenziell schädlichem Einfluss für Mensch und Umwelt. Der Zusammenhang des Einsatzes als TAM und dem Einfluss auf die Umwelt wurde bereits in den 90er-Jahren außerhalb der EU ersichtlich. Infolge der intensiven Behandlung von Rindern in Indien wurde die Population des Weißrückengeiers, welche Diclofenac über Tierkadaver aufnahmen, stark dezimiert (*Oaks et al. 2004*). Eine ähnliche Prognose wurde seit der Zulassung in der EU für europäische Geierpopulationen abgegeben (*Green et al. 2016*). Dies verdeutlicht die hohe Relevanz einer analytischen Überwachung des Diclofenaceintrags in die Umwelt (*Tavazzi et al. 2014*).

Fenbendazol

Fenbendazol gehört zur Gruppe der Benzimidazolcarbamate und ist ein Breitspektrumanthelminthikum mit Haupteinsatzgebiet gegen Endoparasiten wie Nematoden, Cestoden, Giardien und Trichinen. Fenbendazol wird im Gastrointestinaltrakt nur gering resorbiert (*Chassaing et al. 2008*). Es wird in der Leber zu Oxfendazol (Fenbendazolsulfoxid) metabolisiert, was ebenfalls eine anthelmintische Wirkung aufweist (*Short et al. 1988*).

Ivermectin

Ivermectin ist ein makrozyklisches Lacton und ein halbsynthetisches Derivat aus der Gruppe der Avermectine. Es stellt ein Gemisch aus zwei Verbindungen (Ivermectin H₂B_{1a} und H₂B_{1b}) dar, welche sich strukturell durch eine Methylgruppe unterscheiden. Aufgrund der hybriden Struktur des Gemischs vereint es eine hohe Wirkungspotenz mit einem breiten Anwendungsspektrum (*Campbell 1993*). Angewendet wird Ivermectin in der Veterinärmedizin gegen endoparasitische Nematoden und Ektoparasiten wie Zecken, Läuse, Milben und Flöhe. Ivermectin ist eine lipophile Verbindung, die sich nach oraler oder parenteraler Verabreichung über den Blutkreislauf im Fettgewebe anreichert. Über 90 % werden als unmetabolisierter Wirkstoff über den Kot von behandelten Nutztieren abgegeben (*Campbell 1993*). Dies hat zur Folge, dass es bei Freilandhaltung zur Anreicherung des Wirkstoffs im Boden und damit zu Eintragung in Gewässern kommen kann. Außerdem werden Mikroorganismen, welche Koprophagie (Verzehr von Fäzes) betreiben, geschädigt. Hieraus ergibt sich ein unmittelbarer Einfluss auf den ökologischen Stoffkreislauf, sowie spezifische Nahrungsketten, denen ihre Grundlage entzogen wird.

Monensin

Monensin ist eine antibiotisch wirkende Substanz aus der Gruppe der Polyether-Makrolidantibiotika. Ursprünglich aus dem Bakterium *Streptomyces cinnamonensis* isoliert, ist es heute totalsynthetisch zugänglich (*Nicolaou und Sorensen 1996, S. 185–208*). Es wirkt als Ionophor und bildet Komplexe mit einfach geladenen Kationen. Die antibiotische Wirkung beruht auf der Inhibierung des Transportes von Proteinen innerhalb bzw. zwischen Zellen (*Huczyński et al. 2008*). Monensin wird deshalb in der industriellen Gefügelhaltung gegen Endoparasiten wie Kokzidien eingesetzt. Eine Verwendung als Wachstumsfaktor für die Viehmast wurde im Jahr 2006 verboten (*Castanon 2007*).

Paracetamol

Paracetamol ist eine Aminophenolverbindung und zählt zu den Nichtopioid-Analgetika. Zusätzlich verfügt es über antipyretische Eigenschaften. In der Heimtiermedizin findet Paracetamol aufgrund von Toxizität und potenziell leberschädigenden Nebenwirkungen nur bedingt Anwendung. Weitere Einschränkungen sind die kurze Halbwertszeit (je nach Tierart nur wenige Stunden) sowie die fehlende antiphlogistische Wirkung. Haupteinsatzgebiet im Nutztierbereich ist die orale Applikation bei Schweinen. Hier ist allerdings keine Begrenzung der Rückstandsmengen vorgeschrieben (*Löscher et al. 2014*).

Phenylbutazon

Phenylbutazon ist ein nichtsteroidales Antiphlogistikum und strukturell ein Derivat der Pyrazolidindione. Es hat analgetische, antiphlogistische und antipyretische Eigenschaften. Für lebensmittelliefernde Tiere herrscht ein EU-weites Verwendungsverbot (*Anonymus 2013*). Neben der humanmedizinischen Verwendung kommt der Wirkstoff vornehmlich in Klein- und Großtierpraxen zum Einsatz. Der Wirkstoff kann oral, intramuskulär oder intravenös verabreicht werden. Es erfolgt eine nahezu vollständige Resorption im Magen-Darm-Trakt und eine Metabolisierung in der Leber zu Oxyphenbutazon. Von gesonderter analytischer Relevanz ist Phenylbutazon im Pferdesport, da es missbräuchlich als Dopingmittel genutzt wird und auf der Liste der zu kontrollierenden Substanzen steht (*You et al. 2009*).

Prednisolon

Prednisolon ist ein synthetisches Glucocorticoid mit entzündungshemmender und antiallergischer Wirkung. Es wird als systemisches Antiphlogistikum und zur immunsuppressiven Behandlung eingesetzt. Es ist ein Standardglucocorticoid für alle Tierarten. Im Vergleich zu anderen steroidal Medikamenten zeichnet es sich durch eine 4- bis 5-fache Steigerung der glucocorticoiden Wirkung bei geringeren Nebenwirkungen sowie längerer Halbwertszeit aus. Im Nutztierbereich kommen vornehmlich intramuskulär applizierte Injektionssuspensionen zum Einsatz. Diese bieten Vorteile im Hinblick auf die Steuerbarkeit infolge eines schnelleren Wirkungseintritts und einer kürzeren Wirkungsdauer. Gerade bei der Anwendung an lebensmittelliefernden Tieren (Rinder) kommt diese Eigenschaft aufgrund fehlender Festlegung von Rückstandshöchstmengen zum Tragen (*Löscher et al. 2014*).

Tinidazol

Tinidazol ist ein Antiinfektivum aus der Gruppe der Nitroimidazole mit bakterizider und antiparasitärer Wirkung. Zum Einsatz kommt es bei der Behandlung von Infektionen mit anaeroben Bakterien oder Protozoen (*Carmine et al. 1982*). Der Einsatz von Nitroimidazolen bei lebensmittelliefernden Tieren ist in der EU seit dem Jahr 2002 untersagt (*European Union 2002*). Zur Erweiterung des Spektrums der zu untersuchenden Substanzklassen und aufgrund der einfachen Verfügbarkeit wurde Tinidazol in die Liste der betrachteten veterinärmedizinischen Arzneistoffe aufgenommen.

Xylazin

Xylazin zählt strukturell zu den Thiazinaminen und findet Anwendung als Sedativum, Analgetikum und als Muskelrelaxans für alle Haus- und Nutztierarten. Resultierend aus dem Anwendungsgebiet weist es eine sehr kurze Halbwertszeit im Blutplasma auf und wird nach intramuskulärer oder intravenöser Injektion in der Leber metabolisiert. Für die analytische Betrachtung ist die Zuordnung zur Gruppe der spezialisierten Veterinärpharmaka ausschlaggebend.

3-Phenoxybenzoesäure

3-Phenoxybenzoesäure (3-PBA) ist ein Pyrethroid-Metabolit, der durch Esterhydrolyse und Hydroxylierung bei der Detoxifizierung von Permethrin-Derivaten gebildet wird. Es wird aus analytischer Sicht somit als Referenz für den Ab- bzw. Umbau für Cypermethrin verwendet (*Aprea et al. 1997*). Pyrethroid-Metaboliten zeigen keine spezifische physiologische Wirksamkeit.

Oxfendazol

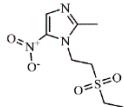
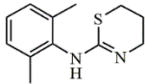
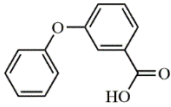
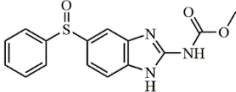
Oxfendazol ist ein anthelmintisch wirkendes Benzimidazol mit einem breiten Wirkspektrum gegen endoparasitische Würmer und findet Anwendung in allen Nutztierbeständen. Es stellt den Sulfoxid-Metaboliten des Fenbendazols dar und dient deshalb ebenfalls als analytische Referenz für die Metabolisierung von Fenbendazol (*Short et al. 1988*).

Mit der umfangreichen Recherche zum Einsatz der nicht-antibiotischen Veterinärpharmaka in der Praxis mit Schwerpunkt Thüringen wurde eine wichtige Basis für die anschließende gezielte Auswahl der Einzelsubstanzen gelegt. In besonderer Weise hilfreich und unterstützend war die enge kooperative Zusammenarbeit und Abstimmung im Rahmen der Projekttreffen mit der TLLLR und darüber hinaus. Aus allen wichtigen Veterinärpharmaka-Klassen, die nicht unter Antibiotika geführt werden, wurden sowohl unter Berücksichtigung der weiteren analytischen Verfahrensentwicklung als auch der teilweise hohen Anschaffungskosten einzelner Substanzen praxisrelevante Wirkstoffe ausgewählt.

Tabelle 2: Übersicht der Struktur und Eigenschaften der verwendeten Standardsubstanzen

Substanz CAS	Struktur	MW g·mol ⁻¹	Löslichkeit
Albendazol 54965-21-8		265,33	schlecht in Wasser
Antipyrin/Phenazon 60-80-0		188,23	sehr gut in Wasser
Cypermethrin 52315-07-8		416,3	schwer in Wasser
Diclofenac 15307-79-6		318,13	praktisch unlöslich in Wasser
Fenbendazol 43210-67-9		299,35	sehr geringer Wasserlöslichkeit
Ivermectin 70161-11-4 (H ₂ B _{1a}) 70209-81-3 (H ₂ B _{1b})		875,10 861,07	nahezu unlöslich in Wasser
Monensin 22373-78-0		692,86	schwer löslich in Wasser
Paracetamol 103-90-2		151,3	wenig in Wasser
Phenylbutazon 50-33-9		308,37	wenig in Wasser
Prednisolon 50-24-8		360,44	sehr schlecht in Wasser

Tabelle 2: Fortsetzung

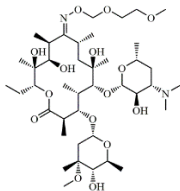
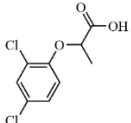
Tinidazol 19387-91-8		247,27	
Xylazin 7361-61-7		220,33	nahezu unlöslich in Wasser
3-PBA 3739-36-6		214,22	
Oxfendazol 53716-50-0		315,35	

Interne Standards

Für die Verwendung als interne Standards (IS) wurden das Makrolidantibiotikum Roxithromycin und das Herbizid Dichlorprop ausgewählt. Sie dienen damit als Bezugsgrößen für das analytische Verfahren und waren nicht Teil der Untersuchung zum Abbauverhalten. Sie wurden ausgewählt, da sie ein ähnliches stoffliches Verhalten wie die untersuchten Tierarzneistoffe aufweisen, jedoch in den untersuchenden Proben nicht vorkommen.

Der Einsatz von internen Standards bildete die Grundlage für die Erstellung einer quantitativen analytischen Methode. Sie dienen als relative Referenzgröße, um die verfahrenstechnischen Auswirkungen auf das Ergebnis abzuschätzen und die Qualität der Methodik evaluieren zu können. Über den IS wurden Rückschlüsse auf Mengenbestimmung und Verluste der Analyten ermöglicht (Tab. 3). Sie wurden in definierter Konzentration zu Beginn des Verfahrens zugegeben und verhielten sich bei der Analyse in gleicher Weise wie die zu untersuchenden Substanzen. Ihre Messung erfolgte simultan und ist methodisch für Analyten und interne Standards reproduzierbar (Xu und Madden 2012, S. 2–6).

Tabelle 3: Übersicht über Struktur und Eigenschaften der eingesetzten internen Standards (IS)

Substanz CAS	Struktur	MW $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	Löslichkeit
Roxithromycin 80214-83-1		837,05	
Dichlorprop 120-36-5		235,06	sehr schlecht in Wasser

Neben der Verwendung von Substanzstandards wurden weitere Reagenzien und Lösungsmittel verwendet, welche in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt sind (Tab. 4).

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel

Reagenz	CAS	Reinheit bzw. Qualität
Aceton	67-64-1	Min. 99,8 %; für die Pestizidanalyse Chemsolute Th. Geyer
Acetonitril	75-05-8	Min. 99,9 %; Gradient Grade für die HPLC Chemsolute Th. Geyer
Ameisensäure	64-18-6	98-100 %; zur Analyse Chemsolute Th. Geyer
Essigsäure	64-19-7	Min. 99,0 %, Eisessig Chemsolute Th. Geyer
Methanol	67-56-1	Min. 99,95 %; für LC-MS Chemsolute Th. Geyer
Bernsteinsäure	110-15-6	min. 99 %, p.a., ACS Sigma-Aldrich
Reinstwasser		Leitfähigkeit $\leq 1,0 \mu\text{S/cm}$ bei 20 °C Gesamter organischer Kohlenstoff (TOC) $\leq 0,5 \text{ mg/l}$
Referenzsubstanzen		Sigma-Aldrich, J&K Scientific, Glentham Life Science

Recherchen zu anbaurelevanten Energie- bzw. Rohstoffpflanzen

Nachfolgend werden einige wichtige anbaurelevante Energie- und Rohstoffpflanzen kurz vorgestellt. Diese können im Rahmen der gezielten Fruchtfolge in Frage kommen, um durch den Zwischenanbau das biologische Abbaupotenzial der Böden gegenüber Xenobiotika verstärkt durch intensive wurzelvermittelte Rhizosphäreneffekte zu nutzen und zu stärken. Damit sollten Rückstandsrisiken durch Pharmaka oder ihre Metaboliten deutlich reduziert werden können. Insbesondere Pflanzen mit ausgeprägter Wurzelbildung sind für den Zwischenfruchtanbau geeignet. Im Rahmen des Projekts konnten Feldversuche auf Parzellen von Raps, Mais und Winterweizen durchgeführt werden.

Raps (*Brassica napus*)



Raps ist eine wirtschaftlich bedeutende Kulturpflanze. Sie wird vor allem zur Gewinnung von Rapsöl und Rapskuchen verwendet. Als ein- oder zweijährige Pflanze erreicht sie Wuchshöhen von 30 bis 150 Zentimeter. Sie kann eine kräftige fleischige Pfahlwurzel ausbilden und ist als über Winter gehende Kultur interessant.

Weizen (*Triticum aestivum/durum*)



Weltweit wird heutzutage vorwiegend Weichweizen (*Triticum aestivum*) angebaut. Er ist eine jüngere Züchtung und genetisch relativ weit vom „Weizen“ entfernt, der in historischen Quellen genannt wird. Der heutige Saatweizen ging aus der Kreuzung mehrerer Getreide- und Wildgrasarten hervor. Die verschiedenen Weizenarten erreichen Wuchshöhen von etwa 0,5 bis 1 m. In Deutschland wird zu mehr als 90 % der Weizenanbauflächen Winterweizen ausgesät.



Weizen stellt das weltweit am dritthäufigsten angebaute Getreide nach Mais (1,15 Mrd. t) und Reis (782 Mio. t) dar. Für viele Menschen ist er als Brotgetreide wichtiges Grundnahrungsmittel, hat große Bedeutung in der Tier-, zu geringeren Anteilen aber auch in der Biogasproduktion als Energiepflanze.

Hanf (*Cannabis sativa*)



Unter Nutz- oder Industrieghanf werden alle Sorten der Gattung *Cannabis* zusammengefasst, die im kommerziellen Anbau genutzt werden. Seine Verwendung als Arznei- oder Rauschmittel spielt in diesem Zusammenhang keine Rolle. Der Nutzhanf wird vor allem zur Gewinnung von Hanffasern angebaut. Weitere Nutzungsprodukte sind Hanfsamen (Hanföl), Hanfschäben sowie Hanfblüten und -blätter.

Mais (*Zea mays*) und Silphie (*Silphium perfoliatum*)



Die Durchwachsene Silphie ist eine typische Energiepflanze. Aufgrund ihrer Anpassung an trockene Standorte ist sie auch für mitteleuropäische Verhältnisse interessant. Sie kann ihre Feuchtigkeit nicht nur aus dem Boden, sondern auch aus den Blattbechern beziehen. Vergleichbar mit Energiemais zeichnet sie sich durch hohe Biomasse und Biogasausbeuten aus.

In Thüringen wurden in Anbauversuchen ab dem zweiten Standjahr Erträge von 18 bis 28t Trockenmasse erreicht. Auch ihr ausgeprägtes Wurzelsystem macht sie als Zwischen- bzw. Begleitfrucht interessant.



Vergleich von Silphie- (links) und Maiswurzel

Körnermais ist eines der Grundnahrungsmittel in Afrika und Lateinamerika. Mehr als 60 % der Welternte werden zu Maissilage verarbeitet und an Nutztiere verfüttert. Energiemais dient als nachwachsender Rohstoff für die Erzeugung von Bioethanol und Biogas. Neben der Verarbeitung in der Lebensmittelindustrie wird die aus Mais gewonnene Stärke als nachwachsender Rohstoff für die Herstellung von bio-basierten Kunststoffen eingesetzt.

Luzerne (*Medicago sativa*)



Luzerne wird weltweit als Nutzpflanze zumeist für Viehfutter, aber auch als Lebensmittel angebaut. Wie andere Leguminosen kann die Luzerne mit Hilfe symbiontischer Knöllchenbakterien Stickstoff aus der Luft fixieren. Sie wächst als ausdauernde krautige Pflanze und erreicht Wuchshöhen von bis zu einem Meter. Ihr tiefreichendes ausgeprägtes Wurzelsystem von über 4,5 Metern Ausdehnung macht sie als Zwischenfrucht auch bei trockener Witterung und schwierigen Böden interessant.

Kleegrasgemenge (*Trifolieae* und *Poales*)



Im Kleegras als Gemenge aus verschiedenen Gras- und Kleesorten ist der Rotklee die häufigste Kleesorte. Typische Grassorten sind ertragreiche Mittel- und Obergräser wie beispielsweise das Italienische Raygras oder Deutsches Weidelgras. Kleegras wird im Feldfutterbau hauptsächlich als Komponente einer spezifischen Fruchtfolge angebaut. Es findet als wichtiges Substrat (u.a. Silage) für Biogasanlagen Verwendung.

Überblick über die untersuchten Matrices

Zur Etablierung der Analysenmethodik kommt neben den zu untersuchenden Analyten den beprobten Matrices eine besondere Bedeutung zu. Zur Erweiterung der Kenntnisse im Umgang mit verschiedenen komplexen Wirtschaftsdünger- und Umweltmatrices, sollte das Verfahren für weitere Umweltmatrices erweitert und erprobt werden. Damit konnte gewährleistet werden, dass mittels einer geeigneten Analytik das Ab- und Umbauverhalten und damit der Stoffstrom über einen vergrößerten Teil des Kreislaufs nachvollzogen werden kann. Aus diesem Grund wurden zum vorhandenen Spektrum, bestehend aus verschiedenen Güllen, Festmistarten und Gärresten von Rindern, Schweinen und Geflügel(-trockenkot), zusätzlich unterschiedliche Bodenarten (Kompost, Mutter- bzw. Ackerboden/Erde) sowie typische Nutz- und Futterpflanzenarten (Raps, Mais, Gerste, Weizen, Kresse) in die Betrachtungen mit aufgenommen. Die damit einhergehenden Probleme durch höhere Komplexität und Matrixeffekte (Gesamtheit aller störenden Faktoren auf die Analytenmessung) mussten durch die Verfahren zur Probenvorbereitung und -messung kompensiert werden.

Eine Optimierung der Selektivität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Nachweisverfahrens für Analyten, Metaboliten und Transformationsprodukte in einem erweiterten Matrixbereich stellte die Grundlage der Untersuchungen im Labor sowie im kleintechnischen Maßstab und in Feldversuchen dar.

Verfahren der Analytik

Als analytische Methode zur Identifizierung und Quantifizierung der organischen Verbindungen wurde das Trennverfahren der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (englisch ‚High Performance Liquid Chromatography‘, HPLC) angewendet. Damit ließ sich eine große Anzahl von Analyten in kurzer Zeit auftrennen sowie qualitativ und quantitativ charakterisieren (Meyer 2008, S. 2). Die durchgeführten Messungen wurden mit einer HPLC in Kopplung mit einem Massenspektrometer durchgeführt. Verwendet wurde ein UltiMate 3000 HPLC-System (Thermo Fisher Scientific) mit einer Reversed-Phase-C18-Trennsäule ‚Kinetex 2,6 µm EVO‘ (Phenomenex) und einem Massenspektrometer ‚API 4000 Triple Quadrupol Mass Spectrometer‘ (AB Sciex).

Zur Steuerung der HPLC wurde die Software *Chromeleon 6.8* (Dionex) verwendet. Die Messungen und Auswertungen der massenspektrometrischen Daten erfolgte mit *Analyst 1.6.3* (AB Sciex). Aus der Kopplung einer HPLC mit Massenspektrometrie (MS) ergeben sich für die Detektion von organischen Spurenstoffen Vorteile bei der Selektivität, der Sensitivität sowie dem Anwendungsbereich in Bezug auf chemische Substanzklassen (Gross 2013, S. 714).

Der Ausschluss von Matrixeffekten (Selektivität), die Senkung der Nachweisgrenze (Sensitivität) und die Erweiterung des Bereichs analysierbarer Substanzen (bspw. polare oder thermolabile Verbindungen) bildeten den Anlass für die Verwendung eines Massenspektrometers als Detektor für die HPLC. Für die quantitative Analytik wurde das ‚Multiple Reaction Monitoring‘-Verfahren (MRM) eingesetzt. Die Messmethode war sehr selektiv. Außerdem hat es eine Erhöhung der Sensitivität zur Folge, da mehr Zeit auf die Messung definierter Masse-zu-Ladung-Verhältnisse (m/z) aufgewendet werden konnte (*Kondrat et al. 2002*). Weiterhin ergab sich eine verbesserte Nachweisgrenze, da der Matrixeinfluss vermindert und das Verhältnis von Signal zu Hintergrundrauschen verbessert wurde.

Praktischer Teil

Entwicklung einer angepassten LC-MS-Methodik/Analytik

Voraussetzung für die Entwicklung einer Methode zur Untersuchung von Pharmakarückständen in Wirtschaftsdüngern und anderen Umweltmatrices war die Beschaffung von geeigneten Referenzstandards. Viele Substanzen waren nur in Form von Mischstandards 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 Pharmaka und Matrices umfassend abzubilden.

Aufbereitung, Ansatz, Extraktion, HPLC-MS-Methodik

Probenaufbereitung

Unter der Bezeichnung Wirtschaftsdünger sind alle organischen Substanzen (tierische und pflanzliche Herkunft) zusammengefasst, welche in der Agrarwirtschaft eingesetzt werden, um dem Boden Nährstoffe zuzuführen. Gülle, Jauche und Mist sowie Stroh, Pflanzenfasern und Gärreste aus der Biogaserzeugung stellen eine sehr heterogene Gruppe von Probenmatrices dar.

Die daraus resultierenden Matrixeffekte bedeuteten für den analytischen Nachweis von Spurenstoffen eine enorme Einschränkung. Der Begriff Matrixeffekt fasst die Gesamtheit aller störenden Faktoren auf die Analytenmessung zusammen und definiert im Speziellen die Auswirkungen co-eluierender Substanzen auf die Ionisierung der Zielanalyten (*Dams et al. 2003*). Die Anforderung an die Probenvorbereitung bestand darin, eine reproduzierbare Grundlage für die Methodenentwicklung zu liefern und dabei Matrixeffekte zu minimieren. Nur so konnte die Entwicklung einer exakten und robusten Analytik für ein breites Spektrum an Veterinärpharmaka gewährleistet werden.

Probenansatz

Alle Wirtschaftsdüngerproben und weiteren Substrate stammten von Agrarbetrieben aus dem Nordwesten Thüringens und wurden über den gesamten Zeitraum der Projektlaufzeit genommen. Um sicherzustellen, dass alle Proben homogen und unbelastet von Pharmakarückständen (Blindwerte) sind, wurden sie den Literaturvorgaben folgend, gelagert bevor der Probenansatz erfolgte (*Bassler 1995*). Alle Substrate wurden nach der Lagerung gefriergetrocknet (SRK Lyovac GT2) und anschließend vermahlen (Scheibenschwing- und Propellerschlagmühle). Die Einwaage der Substrate (Trockenmasse) erfolgte unter der Maßgabe, eine reproduzierbare und homogene Grundlage für eine analytische Methodenentwicklung und Probenmessung zu gewährleisten. Die Proben wurden je nach Bestimmungszweck auf verschiedene Art behandelt. Sofern mit den Proben die analytische Methodik etabliert werden sollte, wurden diese mit definierten Konzentrationen der Zielanalyten dotiert (,gespikt'). Wurden Proben mit der optimierten und angepassten Analytik auf ihr Abbauverhalten untersucht, wurde keine Dotierung vorgenommen und die Proben unmittelbar für die Messung behandelt.

Probenextraktion

Für die Extraktion der Substratproben wurde eine Extraktionslösung aus Methanol, konzentrierter Essigsäure und Reinstwasser (6:3:1, v/v) verwendet (Wang et al. 2013). Diese ermöglichte es, störende Matrixeinflüsse abzumindern und gleichzeitig polare hydrophobe Verbindungen zu extrahieren. Das nachfolgende Schema zeigt den Extraktionsablauf (Abb. 6).

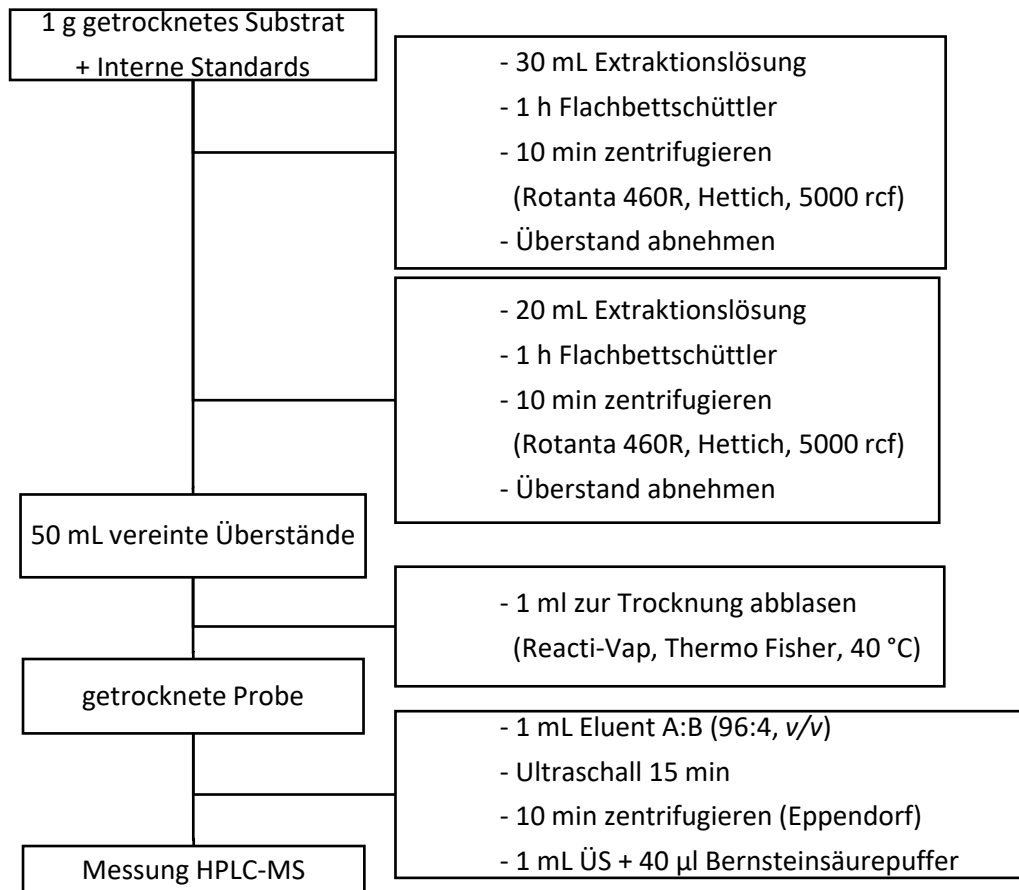


Abbildung 6: Fließschema der Probenextraktion

Um den pH-Wert der Proben für die Messung zu puffern und damit die Stabilität der Analyten zu verbessern, wurde ein Bernsteinsäurepuffer verwendet. Hierzu wurden 5,9 g Bernsteinsäure in einem Liter Reinstwasser gelöst und mit Ammoniumhydroxid auf pH 5,0 eingestellt (Kaufmann et al. 2008).

HPLC-Methode

Die für die chromatographische Trennung der Analyten verwendeten Fließmittel setzten sich aus Reinstwasser (Eluent A) und Methanol (Eluent B) sowie jeweils 5 mM Ammoniumacetat und 0,1 % Ameisensäure zusammen (Primel et al. 2012). Für die Elution wurde das nachfolgende Gradientenprogramm verwendet (Tab. 5). Im Zuge der Optimierung konnte für Cypermethrin eine Anpassung des Gradientenprogramms vorgenommen werden. Die Fließmittelgeschwindigkeit lag bei 350 µl/min.

Tabelle 5: Gradientenprogramm der chromatographischen Trennung mittels HPLC

Allgemeines Gradientenprogramm			Gradientenprogramm für Cypermethrin		
Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	96	4	0	70	30
4	96	4	4	70	30
8	0	100	8	0	100
13	0	100	13	0	100
15	96	4	15	70	30
19	96	4	19	70	30

MS-Methode – Optimierung der messspezifischen Einstellungen

Zu Beginn der massenspektrometrischen Messung mussten zunächst für alle zu untersuchenden Analyten die messspezifischen Parameter für das Massenspektrometer optimiert werden. Bei diesem Prozess, der auch als Tuning bezeichnet wird, werden die optimalen Geräteeinstellungen für jede Substanz spezifisch ermittelt. Dazu wurden Lösungen der Substanzen mittels Spritzenpumpe (Syringe Pump 11 Plus, Harvard Apparatus) direkt in die Ionenquelle injiziert.

Die Lösungen hatten je nach Empfindlichkeit der Substanz eine Konzentration von 1 bis 10 µg/ml und wurden mit einer Optimierungslösung nach Herstellervorgaben angesetzt (Wasser-Acetonitril 1:1 v/v, 1 mM Ammoniumacetat, 0,1 % Ameisensäure). Um alle Analyten eindeutig identifizieren und quantifizieren zu können, wurden jeweils die Massenübergänge der zwei häufigsten Produkt- Ionen optimiert (Tab. 6).

Tabelle 6: Übersicht der MRM-Massenübergänge und Retentionszeiten

Substanz	Precursor-Ion (m/z)	→	Produkt-Ion (m/z)	Qualifier (m/z)	Retentionszeit (min)
ESI+					
Albendazol	266,1	→	234,1	(-)	8,90
Antipyrin	189,1	→	56,2	(77,1)	7,98
Cypermethrin	415,9	→	191,0	(127,2)	9,71
Diclofenac	296,1	→	215,1	(278,0)	9,22
Fenbendazol	300,1	→	268,1	(131,1)	9,07
Ivermectin	892,5	→	307,2	(551,3)	10,04
Monensin	693,3	→	675,3	(461,2)	9,88
Oxfendazol	316,1	→	159,0	(284,0)	8,54
Paracetamol	152,1	→	110,1	(65,1)	3,52
Phenylbutazon	309,1	→	120,2	(77,1)	9,10
Prednisolon	361,0	→	147,1	(171,2)	8,68
Tinidazol	248,1	→	128,1	(93,1)	6,72
Xylazin	220,9	→	90,1	(72,1)	7,81
IS Roxithromycin	839,8	→	158,1	(681,4)	8,76
ESI-					
3-Phenoxybenzoesäure	213,0	→	93,2	(169,1)	9,05
IS Dichlorprop	232,9	→	161,0	(125,1)	8,99

Methodenvalidierung des Screeningverfahrens

Bestimmung der Wiederfindungsrate

Um die Qualität und Genauigkeit der Probenvorbereitung und damit auch des Extraktionsverfahrens abschätzen zu können, wurde die Wiederfindungsrate (WFR) der untersuchten TAM herangezogen. Sie wird ermittelt aus dem Quotienten der dotierten Menge des Analyten vor der Extraktion und der Menge des Analyten im Messergebnis nach der Probenverarbeitung

$$WFR = \frac{\text{Masse Analyt}_{\text{gemessen}}}{\text{Menge Analyt}_{\text{dotiert}}}$$

Diese Berechnung beruht auf der Annahme, dass die Proben immer die gleiche Substratmasse (1 g), sowie eine identische Dotierung beinhalten. Die Verwendung des internen Standards als Messreferenz bewirkte dabei den Ausgleich von systematischen Messschwankungen und Matrixeinflüssen. Alle Proben wurden mit jeweils 10 µg der Testsubstanzen gespikt. Dies entspricht einer Konzentration von 200 ng/ml im Extrakt und bildet damit den Bereich der zu erwartenden Mengen bezogen auf reale Substratproben ab.

Kalibrierung der Analysenmethode und Bestimmung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Um eine quantitative Aussage zu den Messergebnissen der Analysenmethode treffen zu können, wurde eine Kalibrierung erstellt. Es wurde eine äquidistante Bestimmung in den Bereichen von 5 bis 50 ng/mL aufgrund der zu erwartenden niedrigeren Konzentrationen der Metaboliten und Transformationsprodukte und von 40 bis 240 ng/mL für alle Analyten angenommen. Alle Kalibrierlösungen wurden mit Reinstwasser, Methanol (96:4, v/v) und 0,1 % Bernsteinsäurepuffer angesetzt. Jeder Kalibrierpunkt wurde in Doppelbestimmung gemessen. Als interner Standard wurde Roxithromycin (100 µg) für alle positiv ionisierbaren Substanzen zugesetzt. Da 3-PBA bei negativer Ionisation sensitiver messbar war, wurde zusätzlich Dichlorprop (10 µg) als interner Standard für die negative Messung zugegeben.

Um die Qualität und Genauigkeit der Kalibrierung abschätzen zu können, wurden die Nachweisgrenze (englisch ‚limit of detection‘, LOD) und die Bestimmungsgrenze (englisch ‚limit of quantification‘ LOQ) bestimmt. Die Nachweisgrenze ist der Parameter der Methode, bei dem eine Messung gerade noch vom Hintergrundrauschen differenziert werden kann. Damit eine Messung noch als nachgewiesen gilt, muss das Signal des Messwertes mindestens die dreifache Höhe der Standardabweichung des Blindwertsignals aufweisen. Die Bestimmungsgrenze hat eine höhere Exaktheit als die Nachweisgrenze und ist ein Maß für die niedrigste quantitativ bestimmbare Konzentration einer Substanz. Die Validierung der analytischen Grenzwerte der Kalibrierung erfolgte nach der DIN-Norm 32645 (DIN 32645:2008-11).

Agrobiotechnologische Verfahrensentwicklung und Abbauersuche

Untersuchungen zum Abbauverhalten - Kleinstgefäßversuche



Abbildung 7: Abbautests der Pharmaka in Kleinstgefäßen

Zur Etablierung der Messanalytik wurden unbelastete Matrices mit einer definierten Konzentration der Analyten dotiert, um Optimierungen des Verfahrens vorzunehmen sowie Probleme im Zusammenhang mit Matrixeffekten durch Extraktion und Messung zu identifizieren.

Die Auswahl der Substrate umfasste Schweinegülle (SG), Hühnertrockenkot (HTK) und Gärreste (GR), welche hauptsächlich aus Rindergülle erzeugt wurden. Als pflanzliches Substrat wurde Stroh (S) zur Beimengung verwendet. Es sollten zum einen der Abbau von TAM auf

unterschiedlichen Düngerarten vergleichend gegenübergestellt und zum anderen geklärt werden, ob die Beimengung eines pflanzlichen Substrates Einfluss auf das Abbauverhalten nimmt. Deshalb wurde zu jeder Düngerart ein zweiter Ansatz mit Strohbeimengung (Verhältnis 1:1) erstellt. In 50 mL Polypropylen-Zentrifugenröhrchen wurde jeweils 1 g Düngersubstrat bzw. 0,5 g Substrat mit 0,5 g Stroh eingewogen. Alle Ansätze wurden in Dreifachbestimmung angesetzt.

Da die Abbauntersuchungen auf mehrere Wochen ausgelegt waren, wurden auf die beschriebene Weise über 540 Probenansätze erstellt (Abb.7). Zu den Ansätzen wurden Standardlösungen der zu untersuchenden Veterinärpharmaka dotiert („Spiking“). Bedingt durch die teilweise sehr schlechte Wasserlöslichkeit der Substanzen, wurde neben einer wässrigen Dotierlösung zusätzlich eine Lösung mit Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Die nachfolgende Tabelle zeigt die eingesetzten Dotierlösungen (Tab. 7).

Tabelle 7: Zusammensetzungen der verwendeten Dotierlösungen und internen Standards

Substanz	Lösungsmittel	Konzentration Standardlösung	Dotiertes Volumen	Zielkonzentration Proben
Antipyrin, Diclofenac, Monensin, Paracetamol, Tinidazol, Xylazin	Wasser	10 µg/mL	1 mL	10 µg/g
Albendazol, Cypermethrin, Fenbendazol, Ivermectin, Phenylbutazon, Prednisolon	DMSO	1 mg/mL	10 µL	10 µg/g
Roxithromycin (Interner Standard, ESI+)	Methanol	1 µg/µL	(100 µL)*	100 µg/g
Dichlorprop (Interner Standard, ESI-)	Methanol	1 µg/µL	(10 µL)*	10 µg/g

* Zugabe des IS erfolgte unmittelbar vor der Extraktion

Durch Zugabe der wässrigen Standardlösung (1 mL) wurde eine relative Feuchtigkeit von 50 % eingestellt. Feuchtigkeitsverluste wurden durch Gewichtsüberprüfung ausgeglichen. Die Gefäße wurden unter aeroben Bedingungen (Deckel nicht vollständig geschlossen) in einem Thermostatschrank (20 - 22 °C) gelagert. Die Messung der Proben erfolgte im wöchentlichen Rhythmus. Außerdem wurden zu Beginn des Versuches Blindwerte der undotierten Proben sowie Ausgangskonzentrationen der gespikten Proben ermittelt.

Untersuchungen zum Abbauverhalten im labortechnischen Maßstab - Flaschenversuche

In mehrmonatiger gezielter Verfahrensführung in 1 L-Gefäßen wurden dotierte Substrate durch wöchentlich einmaliges Aufschütteln aeroben Abbautests unterzogen. Mittels nachfolgender kontinuierlicher Probenahmen der verschiedenen Ansätze bzw. Varianten wurde das Abbauverhalten der dotierten Wirkstoffe ermittelt. Verschiedene Varianten bzw. dotierte Substrate wurden vergleichend eingesetzt: Erde/Mutterboden, Kompost, Stroh, Hühnertrockenkot mit Stroh, Rindergärrest mit Stroh, Gärrest Rind mit Stroh, Rindergülle mit Stroh, Schweinegülle + Stroh und Rinderfestmist.

Im Anschluss wurde die Konzentration der Dotierungslösung in Bezug auf die Trockenmasse der Substrate errechnet. Dazu wurde die relative Feuchte (rH) mittels Feuchtwage ermittelt und Anhand der Einwaage der Anteil an Trockenmasse mit definierten Spikelösungen versetzt.

Da die Gülleproben teilweise eine Feuchtigkeit von >90 % aufwiesen wurde diese im Vorfeld zentrifugiert bzw. sedimentiert und ein Teil des Überstandes abgenommen. In *Tabelle 8* sind Trockenmasse der Einwaage und relative Feuchtigkeit sowie das Volumen der Spikelösung dargestellt. Es wurde verwendet, um eine Zielkonzentration von 10 µg/g Trockenmasse der verschiedenen Wirkstoffe einzustellen (Tab. 8).

Tabelle 8: Berechnung der Einwaagen der Referenzstandards zum Ansatz der Dotierlösung bezogen auf relative Feuchtigkeit der Matrices

Matrix	rH in %	TM Matrix in g	TM Matrix+Stroh in g	m Referenzstandard in mg	V Dotierlösung in mL
Erde	7,09	300	-	3,00	15,0
Kompost	31,99	300	-	3,00	15,0
Stroh	12,8	120	-	1,20	6,0
HTK+Stroh	9,23	200	220	2,20	11,0
GR+Stroh	69,81	50	103	1,03	5,1
RG+Stroh	71,3	30	56	0,56	2,8
SG+Stroh	57,94	30	51	0,51	2,6
RiMi	21,95	300	-	3,00	15,0

Die Dotierlösung umfasste alle Substanzen mit Ausnahme der beiden Metaboliten (3-PBA und Oxfendazol), da über deren Entstehung die Ab- und Umwandlungsprozesse nachvollzogen werden sollten. Die TAM wurden in DMSO:Wasser (8:2 v/v) gelöst und mittels Sprühflasche schichtweise aufgetragen. DMSO wurde gezielt als Lösungsmittel verwendet, da einerseits eine vollständige Lösung der Analyten gewährleistet wird und andererseits keine Einschränkung des Matrix-Mikrobioms im Vergleich zu anderen organischen Lösungsmitteln zu erwarten ist. Durch das schichtweise Besprühen sollte eine homogene Verteilung der Veterinärpharmakalösung innerhalb der Matrices gewährleistet werden. Alle Proben wurden nach erfolgter Dotierung nochmals homogen durchmischt und eine erste Probe wurde zu Ermittlung der eingestellten Zielkonzentration genommen.

Die Probennahme erfolgte anfänglich im täglichen Rhythmus in Doppelbestimmung. Im weiteren Versuchsverlauf wurden die Probennahmeintervalle verlängert.

Untersuchungen zum Abbauverhalten - Feldversuche

Die Übertragung und Anwendung der Erkenntnisse aus den labortechnischen Versuchsaufbauten erfolgte in Kooperation mit zwei Agrarbetrieben und umfasste Untersuchungen der Praktikabilität der Analysenmethodik sowie das Ab- und Umwandlungsverhalten der Veterinärpharmaka bei Freilandbedingungen unter dem Einfluss biotischer Faktoren und realer Bodeneigenschaften. Die Simulation eines praxisnahen Verfahrens wurde anhand von Versuchspartzen an beiden Standorten erprobt (Abb. 8).



Freilandparzellenversuch WH, Winterweizen



Freilandparzellenversuch WH, Mais abgeerntet, mit GR beaufschlagt



Freilandparzellenversuch AGD, Raps



Freilandparzellenversuch AGD, Mais

Abbildung 8: Freilandparzellenversuche; Oben: Winterweizen und abgeernteter Mais beaufschlagt mit Gärrest am Standort Westhausen; Unten: Raps und Mais am Standort Diedorf

Die Parzellen wurden mit aufgespiktem Gärrest beaufschlagt. Zur Einstellung der Zielkonzentration der Analysensubstanzen von 10 µg/g Trockenmasse wurden jeweils 50 kg bzw. 50 L Gülle mit einer DMSO-Dotierlösung versetzt. Hierzu wurde die Einwaage der Substanzen erneut unter Berücksichtigung der relativen Feuchtigkeit der Matrix berechnet. Somit wurden in einem Liter DMSO je 85,2 mg der Referenzsubstanzen (Ausnahme: Natriumsalze von Monensin 87,9 mg und Diclofenac 91,5 mg) vollständig gelöst und der gesamte Ansatz mit je 50 L Rindergülle vermischt. Die Zugabe erfolgte portionsweise in 10 L-Schritten unter konstantem Rühren. Je Versuchspartze (1 m²) wurden 10 L des Ansatzes aufgebracht und eingearbeitet. Dabei wurde eine Kontamination des Pflanzenmaterials durch das dotierte Substrat vermieden. Die Beprobung in Doppelbestimmung erfolgte anfänglich im wöchentlichen Rhythmus und im Verlauf der Versuchszeit unter Berücksichtigung von Witterung und Jahreszeiten in angepassten Zeitintervallen. Es wurde eingangs eine Kontrollmessung des GR durchgeführt, um eine Vorbelastung (Blindwert) auszuschließen.

Der dotierte Ansatz wurde ebenfalls bei jeder Messung als Kontrolle mitgeführt. Die nachfolgende Übersicht zeigt Aufbau und Durchführung der Probennahme der Feldversuche (Tab. 9).

Tabelle 9: Parzellenaufbau und -beprobung der Freilandversuche

Betrieb	Pflanzenart	Parzelle- bzw. Probenbezeichnung
AG Diedorf (AGD)	Raps	Kontrollparzelle Rindergärrest ohne Dotierung
		Versuchsparzelle Rindergärrest dotiert
		Versuchsparzelle Rindergärrest + Stroh dotiert
	Mais	Kontrollparzelle Rindergärrest ohne Dotierung
		Versuchsparzelle Rindergärrest dotiert
		Versuchsparzelle Rindergärrest + Stroh dotiert
MPG Westhausen (WH)	Mais, abgeerntet	Kontrollparzelle Rindergärrest ohne Dotierung
		Versuchsparzelle Rindergärrest dotiert
		Versuchsparzelle Rindergärrest + Stroh dotiert
	Winterweizen	Kontrollparzelle Rindergärrest ohne Dotierung
		Versuchsparzelle Rindergärrest dotiert
		Versuchsparzelle Rindergärrest + Stroh dotiert

Untersuchungen zum Abbauverhalten - Pflanzenversuche



Abbildung 9: Gefäßversuche im Labormaßstab

Für die Untersuchung des pflanzlichen Materials wurde im ersten Schritt ein labortechnischer Ansatz mit Gartenkresse (*Lepidium sativum*) und Gerste (*Hordeum vulgare*) durchgeführt sowie im zweiten Schritt die Prüfung der Pflanzenteile aus den Feldversuchen – Raps (*Brassica napus*) und Weizen (*Triticum aestivum*) – vorgenommen. Analog den beschriebenen Parzellenversuchen wurden zur Kultivierung von Kresse und Gerste je drei Ansätze mit undotiertem Rindergärrest, dotiertem Rindergärrest und dotiertem Gärrest mit Strohbeimengung angesetzt (Abb. 9).

Die Beprobung erfolgte in Doppelbestimmung und umfasste für den Laboransatz neben den gefriergetrockneten Pflanzenteilen auch die jeweilige Anzuchtmatrix in Form von Erde mit undotiertem bzw. dotiertem Rindergärrest (10 µg/g Trockenmasse). Das Pflanzenmaterial der Feldversuche wurde unabhängig von der Bodenmatrix untersucht, da diese im Bereich der Feldversuche separat betrachtet wird. Stattdessen wurde hierbei zwischen Sprossachse, Blattwerk und Rhizom unterschieden, um Unterschiede bzw. Anreicherungen zu identifizieren.

Untersuchungen zum Abbauverhalten - Kleintechnische Versuche ‚Miststapel‘

Der Versuchsaufbau charakterisiert einen anoxischen Abbauweg unter naturnahen abiotischen Bedingungen (relativ konstante Temperatur, pH, Feuchtigkeit innerhalb der Schichtung) und ermöglichte zusätzliche Einblicke in das Auswaschungsverhalten der Pharmaka. Die Versuchsansätze erfolgten in ‚klassischen‘ Miststapelhaufen in beiden Agrarbetrieben, wobei das undotierte bzw. dotierte Substrat in Polyamidbeutel eingebracht wurde (Abb. 10, oben). Die undotierten und dotierten Substrate wurden dabei zunächst in einen Beutel aus Abacafasern (Teebeutelpapier) gefüllt und mittels umschließenden Kunststoffnetzes bei 50 - 60 % Feuchtegehalt eingebracht (Abb. 10, unten).

Durch nachfolgende regelmäßige Probenahmen der dotierten Substrate in den permeablen Probengefäßen wurde das Abbauverhalten der dotierten Wirkstoffe ermittelt. Die Wirtschaftsdüngeransätze Gärrest Diedorf (AGD) und Gärrest Westhausen (WH) mit Stroh wurden für Untersuchungen zum Abbauverhalten der ausgewählten Pharmaka undotiert und dotiert eingesetzt. Hierzu wurde der jeweilige Gärrest mit der Dotierlösung versetzt, so dass der Ansatz auf eine Wirkstoffkonzentration von 10 µg/g Trockenmasse des Substrats eingestellt werden konnte.



Miststapel in MPG WH



Miststapel in AGD



„Säckchen“ im geöffneten Miststapel (Winter)



„Säckchen“ im geöffneten Miststapel (Frühjahr)

Abbildung 10: Versuchsaufbau 'Miststapel' im technischen Maßstab an den Standorten Westhausen (links) und Diedorf (rechts); Unten: Eingelagerte Probenansätze unter Mistschichtung in geöffnetem Zustand

Untersuchungen zum Abbauverhalten - Vererdung von Gärrest

Zusätzlich zum Projektinhalt wurde die Thematik der Vererdung von Gärrest aufgenommen. Zwei Kunststoffbehälter (Boden gelocht; max. Füllvolumen ca. 500 L) wurden mit Gärrest AGD befüllt, wobei der Boden mit je 10 cm Stroh bedeckt wurde (Abb. 11). Während ein Behälter mit 400 L GR beaufschlagt wurde, konnte der zweite Behälter mit 350 L GR und einer Mischung aus 30 L Stroh, 20 L Einheits- bzw. Komposterde und Steinmehl befüllt werden. Das entstehende Sickerwasser wurde über Auffangwannen gesammelt.



Abbildung 11: Vererdungsbehälter; Vererdungsbehälter mit GR; Vererdungsbehälter mit GR und Zuschlägen

Begleitende mikrobiologische Untersuchungen und Bewertungen

Ein wesentlicher Effekt der Ausbringung von veterinärmedizinisch relevanten Pharmaka bzw. Wirkstoffen im Wirtschaftsdünger ist die Veränderung der mikrobiellen Bodenflora. Dabei sind sowohl unmittelbare Wirkungen auf die Organismendichte und Zusammensetzung, als auch hygienische Problematiken, sowie Prozesse von Anpassungen und Resistenzen gegen die Wirkstoffe zu erwarten und auch belegt (*Martínez 2017*). Die unmittelbaren Auswirkungen sind je nach Ausbringung lokal und temporär beschränkt.

Proben von Wirtschaftsdünger in Form von Gülle, Kot, Gärresten aus der Biogasgewinnung, Mischungen mit Stroh, sowie Boden- und Kompostproben standen als Ausgangsmaterial sowie nach Behandlungsprozessen zur Verfügung. Es wurden Proben aus Laborversuchen und verschiedenen Freilandversuchen verwendet und für die mikrobiologische Analyse aufgearbeitet.

Abhängig von der Konsistenz (Feststoffanteil, faserhaltiges Material) wurden Verfahren eingesetzt, die sich im Projekt *Abiotec* bewährt hatten und optimiert werden konnten, um beispielsweise die enthaltenen Mikroorganismen zur nachfolgenden Kultivierung in Suspension zu bringen. Die erhaltenen Suspensionen wurden auf festen Agar-Nährmedien ausgestrichen und kultiviert.

Für die Bestimmung der Gesamtmenge bzw. -zahlen von kultivierbaren Mikroorganismen – aerobe Bakterien und Pilze – sowie die selektive Differenzierung von Arten, welche als Indikatoren für hygienische Risiken – sowohl für Nutztiere als auch Lebensmittel – anzusehen sind, wurden etablierte Verfahren entsprechend der Standard—Arbeitsanweisungen des IUM Mikrobiologischen Labors (SOP) angewandt. Es 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.

Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen

Im Rahmen einer Wirtschaftlichkeitsabschätzung und ausgehend von den Analysen zum Abbau der veterinärmedizinischen Pharmaka 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 bewertet und auf ihre grundsätzliche Machbarkeit hin überprüft.

Ergebnisse und Diskussion

Validierung der Messmethode – Wiederfindungsraten, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

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

Wiederfindungsrate

An das Probenaufbereitungsverfahren wurden mehrere Ansprüche gestellt. Als Grundlage für eine niedrige Nachweis- und Bestimmungsgrenze musste einerseits eine reproduzierbare und zuverlässige Analytenanreicherung und andererseits die Verminderung von Matrixeffekten gewährleistet sein. Neben den physikochemischen Eigenschaften der untersuchten TAM war die komplexe Matrixzusammensetzung eine weitere Herausforderung. Da alle untersuchten Veterinärarzneistoffe polare, schlecht wasserlösliche Verbindungen darstellen, wurde eine Flüssigextraktion auf der Basis eines organischen Lösungsmittels (Methanol) ausgewählt.

Als weiterer Bestandteil der Extraktionslösung wurde konzentrierte Essigsäure verwendet, um einen Aufschluss der Matrix und Verminderung des Matrixeffektes zu erzielen. Da ein wesentlicher Eintragungsweg von Arzneistoffen durch Wirtschaftsdünger in Böden auf Sorptionsvorgängen beruht, war die Zerstörung der Matrix ein Hauptkriterium für die Eignung des Extraktionsverfahrens. Hinzu kommt, dass in realen Substratproben aufgrund ihrer heterogenen Zusammensetzung neben den zu analysierenden Stoffen weitere Begleit- und Fremdstoffe auftreten und damit bei der Wiederfindung interferieren können. Die Essigsäure fungierte in diesem Fall als Komplexbildner.

Durch Entstehung von Acetaten wird die Bildung von Transformationsprodukten reduziert, was für die Analytik eine Erhöhung der Selektivität zur Folge hatte. Somit ließ sich durch den Einsatz von Essigsäure der Einfluss von Begleitstoffen in Proben mit nicht genau bekannter und inhomogener Zusammensetzung vermindern und der Matrixeinfluss reduzieren.

Um die Extraktion qualitativ bewerten zu können, wurde die Wiederfindungsrate (WFR) in unterschiedlichen Matrices ermittelt. Die nachfolgende Abbildung stellt die prozentualen WFR der Analyten beispielhaft in den Substraten Schweinegülle, Rindergärrest und Hühnertrockenkot sowie Stroh dar (Abb. 12). Zusätzlich wurde vergleichend die Beimengung von Stroh zu den Wirtschaftsdüngern untersucht.

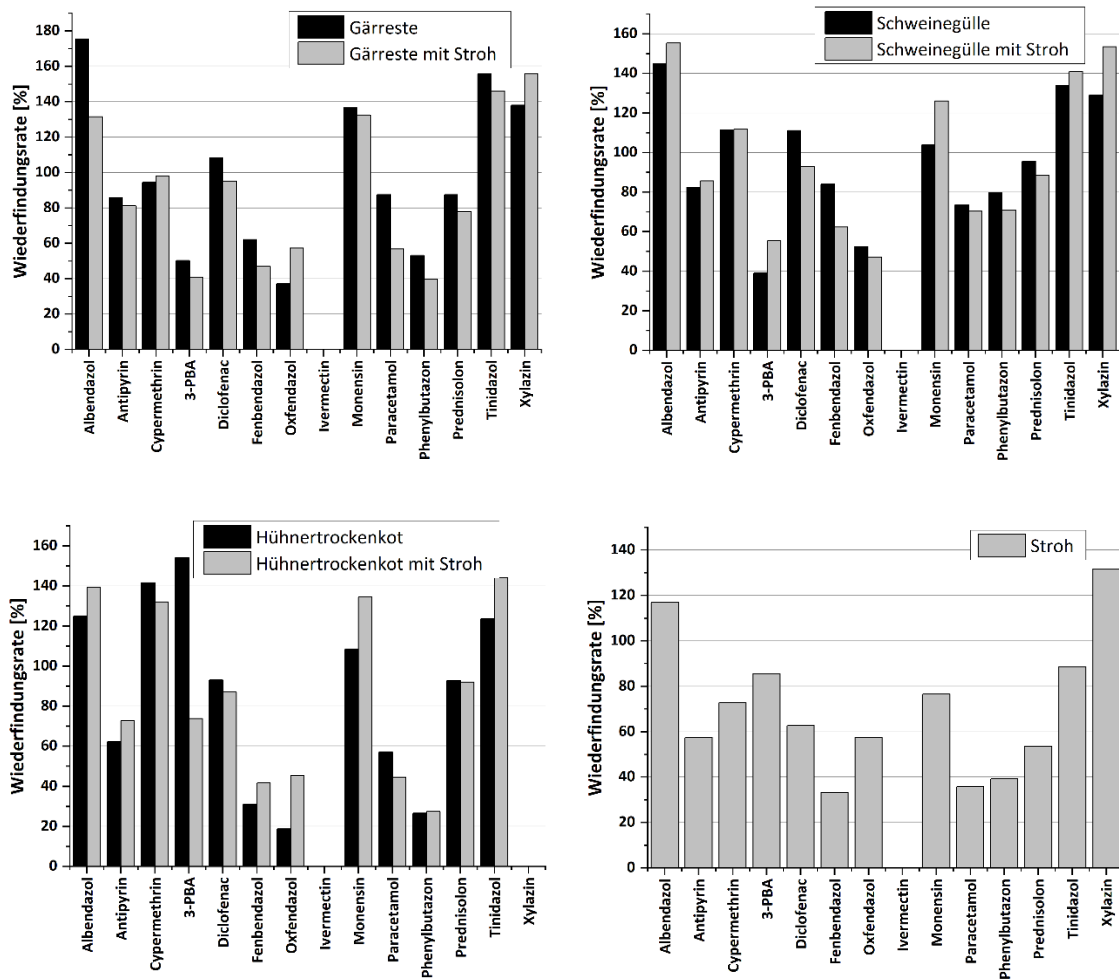


Abbildung 12: Prozentuale Wiederfindungsraten der Analyten in verschiedenen Matrixzusammensetzungen

Es zeigte sich, dass mitunter WFR von über 100 % auftraten (Tab. 10). Dies stand im Widerspruch zu der Annahme, dass ein Abbau der Substanzen durch den Einfluss der Matrix stattfinden muss. Da die WFR den Quotienten aus gemessener und gespikter Konzentration darstellt und eine Bildung (*de novo*) von Analyten auszuschließen war, musste eine systematische Analysenungenauigkeit vorliegen. Bei der Untersuchung von Antibiotikarückständen wäre die Zunahme einer Analytenkonzentration und damit eine WFR > 100 % durchaus denkbar, da durch die mikrobiologische Aktivität in den Substraten antibiotisch wirkende Stoffe entstehen können, die mit den zu messenden Analyten interferieren. Diese Option traf jedoch auf die untersuchten spezialisierten TAM nicht zu. Da die Messung der Konzentration stets in Bezug auf den internen Standard erfolgte, musste in dieser Abhängigkeit die Begründung der Abweichung zu finden sein. Die Analytenkonzentration berechnet sich aus dem Verhältnis der Peakflächen von Analyten und IS. Voraussetzung für diese Annahme ist eine direkte Korrelation beider Signale. Dies ist dadurch gegeben, da sich der IS hinsichtlich Eigenschaften und Reaktionen während der Beprobung der anderen Analyten vergleichsweise ähnlich verhält. Bei der Untersuchung der Düngermatrizes zeigte der interne Standard für die Messung mit positiver Ionisierung (Roxithromycin) schwankende Ergebnisse hinsichtlich der Reproduzierbarkeit seines Signals. Diese Schwankungen hatten direkten Einfluss auf die Konzentrationsbestimmung der Analyten, was wiederum eine Erklärung für die überhöhten WFR lieferte. Dennoch lassen sich daraus relative Tendenzen zur Extraktion ableiten.

Tabelle 10: Prozentuale Wiederfindungsraten der Tierarzneimittel in verschiedenen Zusammensetzungen von Wirtschaftsdüngern; GR – Gärrest, SG – Schweinegülle, HTK – Hühnerkot, S – Stroh

Substanz	GR	GR+S	SG	SG+S	HTK	HTK+S	S
	%						
Albendazol	175	132	145	155	125	139	117
Antipyrin	86	81	83	86	62	73	58
Cypermethrin	95	98	111	112	142	132	73
3-PBA	50	41	39	55	154	74	86
Diclofenac	108	95	111	93	93	87	63
Fenbendazol	62	47	84	62	31	42	33
Oxfendazol	37	57	52	47	19	45	57
Ivermectin	417	458	309	411	161	221	372
Monensin	137	133	104	126	108	135	77
Paracetamol	88	57	74	71	57	45	36
Phenylbutazon	53	40	80	71	27	27	39
Prednisolon	88	78	96	88	93	92	54
Tinidazol	156	146	134	141	124	144	89
Xylazin	138	156	129	154	613	682	132

Alle Substanzen konnten mit dem beschriebenen Extraktionsverfahren in den verschiedenen Matrices nachgewiesen werden. Bis auf Ivermectin (WFR>200 %) lieferten alle WFR in Relation betrachtet die Bestätigung der Anwendbarkeit auf die untersuchten Substrate.

Die Beimengung von Stroh zeigte beim direkten Vergleich in den meisten Fällen eine niedrigere WFR, was den Schluss zuließ, dass hier ein stärkerer Abbau stattfand. Ausgenommen hiervon sind Albendazol, Monensin, Tinidazol und Xylazin, welche eine Erhöhung im Vergleich zu ungemischten Substraten aufwiesen. Gleicht man diese Erkenntnis mit den WFR der genannten Analyten in reinem Stroh ab, so wiesen sie auch dort die höchsten Werte auf. Eine Anreicherung durch Sorptionseffekte wäre dementsprechend denkbar und müsste durch weitere Versuche überprüft werden.

Die Metabolite Oxfendazol und 3-PBA konnten ebenfalls in allen Matrices nachgewiesen werden, was den Beleg für Transformationsprozesse ergab. Ihre mitunter niedrigen WFR lassen sich durch die kurze Verweilzeit der Proben begründen. Bei der Betrachtung über einen längeren Zeitraum, zeigte sich ein deutlicher Konzentrationsanstieg (siehe Kapitel *Untersuchungen zum Abbauverhalten*). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle untersuchten TAM mit dem angewendeten Extraktionsverfahren für eine Analyse methodisch zugänglich waren und somit die Möglichkeit einer Bilanzierung des Abbauverhaltens bei entsprechender Kalibrierung gegeben ist. Zudem ließe sich die Qualität der Messung durch spezifisch angepasste interne Standards weiter verbessern.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Um neben der qualitativen auch eine quantitative Messung durchführen zu können, wurden alle TAM auf den erwarteten Konzentrationsbereich kalibriert. Dieser lag zwischen 40 und 240 ng/mL für alle Analyten, die aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften positiv ionisiert (ESI+) wurden, um eine höhere Sensitivität bezogen auf die gemessene Signalstärke zu erzielen. Die Ausnahme bildete der Metabolit 3-PBA, der bei negativer Ionisierung (ESI-) sensitiver messbar war und aufgrund dessen im Bereich von 5 bis 50 ng/mL kalibriert wurde. Analog zur Bestimmung der Wiederfindungsrate erfolgte die Bestimmung der Kalibrierpunkte in Korrelation zum zugehörigen internen Standard.

Ziel war es hierbei, zufällige Fehlerquellen des Extraktionsverfahrens (Volumenfehler, Verlust von Lösungsmitteln) sowie Matrixeffekte (Ionisierungsunterschiede, Fremdstoffe, Ionenkonzentrationen) zu vermindern. Für die Validierung der Ergebnisse wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LOD und LOQ) statistisch nach der DIN 32645:2008:11 errechnet. Hierbei gilt eine Verbindung ab einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 als nachgewiesen (LOD). Die Bestimmungsgrenze wird auf ein Signal-Rausch-Verhältnis von 10:1 festgelegt (LOQ). In der nachfolgenden Tabelle sind die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der HPLC-MS/MS-Methode aufgeführt (Tab. 11).

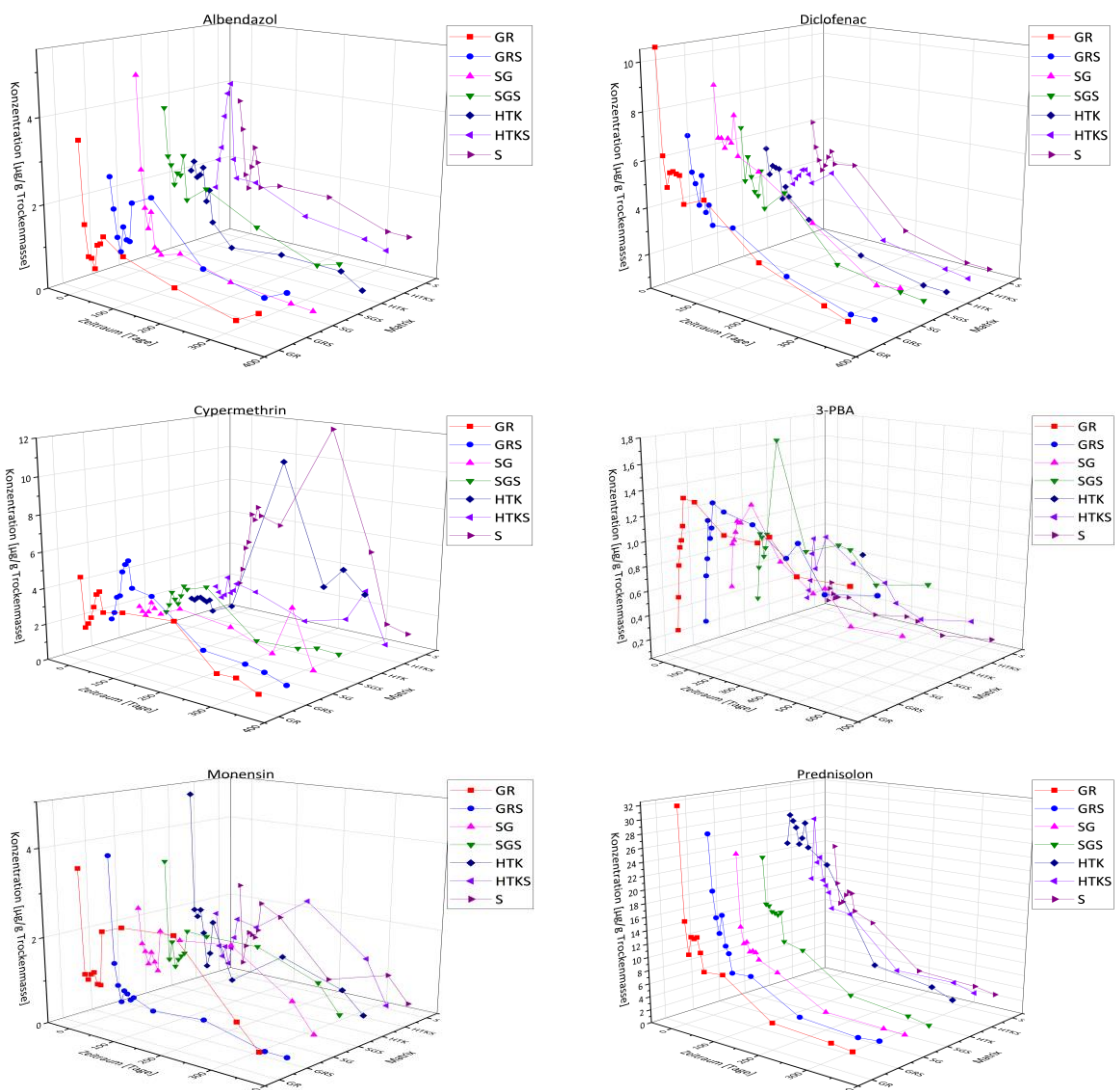
Tabelle 11: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der TAM nach DIN 32645:2008:11 in Kleinstgefäßversuch sowie den restlichen Versuchsaufbauten

Kalibrierung Kleinstgefäße				Kalibrierung restliche Versuche			
Substanz	LOD	LOQ	R ²	Substanz	LOD	LOQ	R ²
	µg/g	µg/g	-		µg/g	µg/g	-
Albendazol	0,219	0,715	0,9422	Albendazol	0,076	0,264	0,9927
Antipyrin	0,078	0,269	0,9923	Antipyrin	0,052	0,184	0,9965
Cypermethrin	0,076	0,264	0,9926	Cypermethrin	0,067	0,235	0,9942
Diclofenac	0,057	0,201	0,9958	Diclofenac	0,049	0,172	0,997
Fenbendazol	0,253	0,786	0,921	Fenbendazol	0,147	0,495	0,973
Ivermectin	0,685	2,230	0,6247	Ivermectin	0,252	0,814	0,9249
Monensin	0,145	0,488	0,9738	Monensin	0,091	0,314	0,9895
Oxfendazol	0,062	0,216	0,9951	Oxfendazol	0,053	0,187	0,9964
Paracetamol	0,102	0,350	0,9868	Paracetamol	0,063	0,219	0,995
Phenylbutazon	0,042	0,148	0,9978	Phenylbutazon	0,048	0,170	0,997
Prednisolon	0,099	0,339	0,9877	Prednisolon	0,043	0,154	0,9976
Tinidazol	0,120	0,408	0,9819	Tinidazol	0,043	0,153	0,9976
Xylazin	0,058	0,203	0,9957	Xylazin	0,056	0,198	0,9959
3-PBA	0,063	0,220	0,9949	3-PBA	0,063	0,220	0,9947

Anhand des Korrelationskoeffizienten R bzw. des Bestimmtheitsmaßes R² wurde statistisch validiert, dass die zugrundeliegenden Kalibrierpunktpaare innerhalb der Vertrauensbereichsgrenzen lagen und somit für die Erstellung der Kalibriergeraden geeignet waren. Dies bedeutete, dass sich alle Nachweis- und Bestimmungsgrenzen auf dem erwarteten Niveau befanden und somit die Zuverlässigkeit und Präzision des Messverfahrens gewährleistet war.

Abbautests in Kleinstgefäßversuchen

Die Grafiken der Abbaukurven stellen das matrixabhängige Abbauverhalten der Veterinärmedikamente in Langzeitversuchen im Labor- Kleinstmaßstab gegenüber (Abb. 13, Anhang Abb. 29). Alle Substanzen zeigten eindeutige, zeitlich differenzierte Abbautendenzen, die im Vergleich der verschiedenen dotierten Matrices mehr oder weniger auffällig waren. Diclofenac, Monensin, Paracetamol, Prednisolon, Phenylbutazon, Tinidazol und Xylazin wurden in nahezu allen Matrices vollständig eliminiert. Die Düngermatrices HTK/HTKS und (reines) Stroh wiesen für einzelne Wirkstoffe (Albendazol, Antipyryn, Paracetamol, Tinidazol, Xylazin) verzögerte und/oder geringere Abbautrends auf. Für Cypermethrin zeigte sich mit der Eliminierung ein unmittelbarer Anstieg des Metaboliten 3-PBA, was für intensive mikrobielle Umsetzungen spricht. Zwischenzeitliche Peaks bzw. Anstiege bei HTK und Stroh können mit ungleichmäßiger Dotierung der Matrices oder Adsorption an die Gefäßwand zusammenhängen. Die Substanzen Paracetamol, Phenylbutazon und Tinidazol waren auffallend schnell reduziert worden. Mit dem Abbau von Fenbendazol ging ein Anstieg des Metaboliten Oxfendazol und dessen sukzessive, matrixabhängige Elimination einher. Insgesamt kann festgestellt werden, dass die Düngermatrices in der Variante mit Stroh ein verbessertes Abbauverhalten aufwiesen. Dies sollte damit zusammenhängen, dass über die Komponente Stroh vielfältige Mikroorganismen (u.a. Pilze) und ihre co-metabolischen Aktivitäten stimuliert werden.



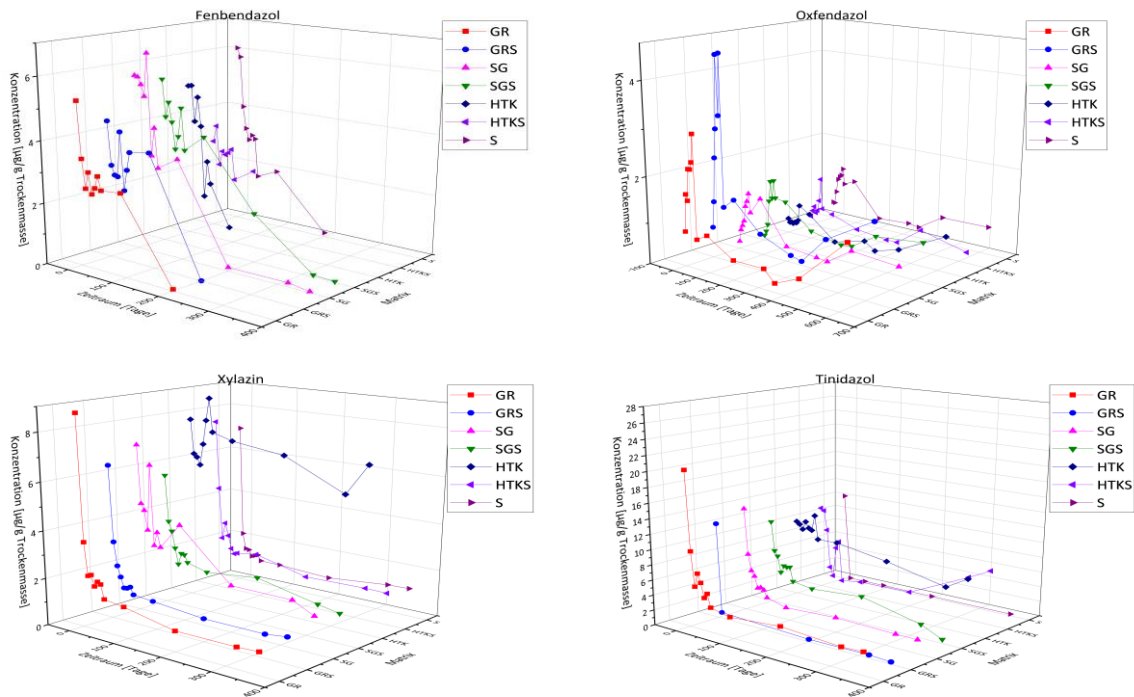


Abbildung 13: Ergebnisse der Abbautests in Kleinstgefäßen; Albendazol, Diclofenac, Cypermethrin, 3-PBA (Metabolit), Monensin, Prednisolon, Fenbendazol, Oxfendazol (Metabolit), Xylazin, Tinidazol; GR - Gärrest, SG - Schweinegülle, HTK - Hühnertröckenkot, S – Stroh

Labortechnische Abbauprobungen - Flaschenversuche

Die Ergebnisse der Abbauprobungen zu den veterinärmedizinischen Wirkstoffen im Rahmen maßstäblich erweiterter ‚Flaschenversuche‘ in verschiedenen Wirtschaftsdünger­matrices im Vergleich zum Boden (Erde) und Kompost sind in *Abbildung 14* dargestellt (Abb. 14, Anhang Abb. 30). Alle Substanzen zeigten im Versuchsverlauf für alle Matrices klare Abbautendenzen bis hin zur vollständigen Reduzierung des Originalwirkstoffs. Mit der Eliminierung von Cypermethrin ging ein Anstieg des Metaboliten 3-PBA einher, dessen weiterer Abbau matrixabhängig war. Dies bestätigte sich auch für Fenbendazol und seinen Metaboliten Oxfendazol, dessen Reduzierung bei Rindermist, Erde und HTK offensichtlich längere Zeiträume benötigt. Aufgrund der intensiven Beprobung und Doppelbestimmung zu Beginn der Versuche konnten im späteren Beprobungszeitraum für einzelne Matrices (z.B. Stroh) keine Messungen erfolgen, da das Substrat verbraucht war.

Auch bei den ‚Flaschenversuchen‘ zeigte sich, dass bei der Dotierung der Ausgangsmatrices eine homogene Dotierung und Durchmischung einerseits schwierig, andererseits aber wesentlich ist, um die Bildung von Akkumulationen und Inhomogenitäten im jeweiligen Substrat zu vermeiden. Bei einzelnen Substanzen (Antipyrin, Diclofenac, Fenbendazol, Tinidazol) zeigte die Matrix Erde ein auffallend geringeres Abbaupotenzial als vergleichsweise Düngermatrices mit Stroh. Bei Kompost konnte dieser Effekt für Tinidazol gefunden werden, wobei hinsichtlich der anderen Wirkstoffe ein auffallend guter Abbautrend zu sehen war. Bei den Wirkstoffen Paracetamol, Prednisolon und Phenylbutazon setzte der Abbau in allen Matrices zeitlich sehr schnell ein, was in der Wasserlöslichkeit ihrer Metaboliten begründet liegen könnte.

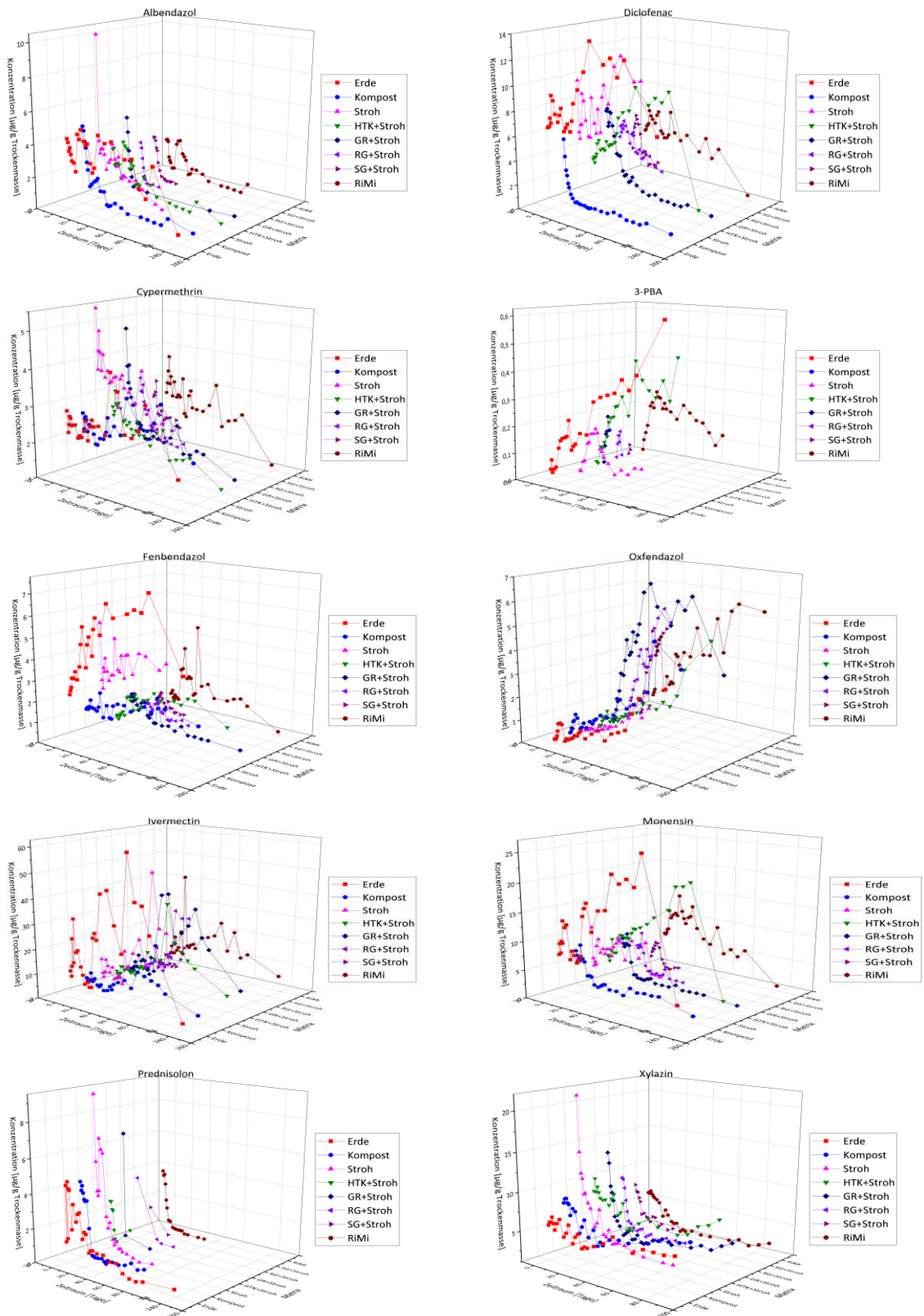


Abbildung 14: Ergebnisse der Abbautests in Flaschenversuchen; Albendazol, Diclofenac, Cypermethrin, 3-PBA (Metabolit), Fenbendazol, Oxfendazol (Metabolit), Ivermectin, Monensin, Prednisolon, Xylazin; HTK - Hühnertrockenkot, GR - Gärrest, RG - Rindergülle, SG - Schweinegülle, RiMi - Rindermist

Feldversuche

Im Vergleich der Zusammensetzung der beprobten Matrices wurden der Anteil der wichtigsten anorganischen Düngerparameter gegenüberstellend ermittelt. In *Tabelle 12* sind die eingesetzten Gärreste aus der Milchproduktionsgesellschaft Westhausen (WH) und der Agrargenossenschaft Diedorf (AGD) in ihrer Nährstoffzusammensetzung aufgeschlüsselt (Tab. 12).

Tabelle 12: Vergleich der Nährstoffzusammensetzungen der Gärreste

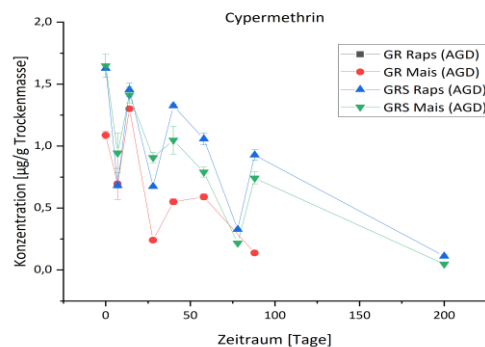
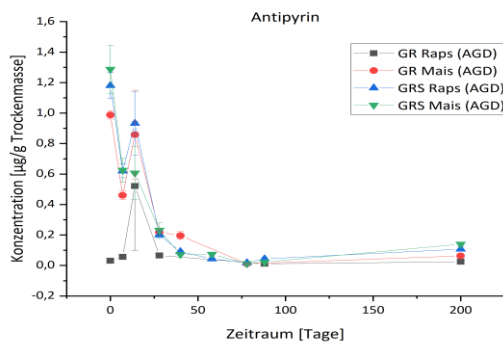
	Westhausen		Diedorf	
	OS in %	TM in %	OS in %	TM in %
Trockensubstanz	6, - 6,7		4,8 - 5,4	
Organische Substanz	5,2	77,7	3,5 - 3,6	70,7 - 72,9
Stickstoff (N) gesamt	0,47	7,03	0,32 - 0,38	6,3 - 7,5
Anteil Ammonium (NH ₄ -N)	0,22	3,29	0,21 - 0,24	4,1 - 4,7
Phosphor (P ₂ O ₅) gesamt	0,17	2,5	0,06 - 0,12	1,8 - 2,4
Kalium	0,42	6,3	0,28 - 0,33	5,8 - 6,4

OS: Originalsubstanz; TM: Trockenmasse

Standort AGD

Die *Abbildungen 15* und *16* veranschaulichen das Abbauverhalten und die Abbautendenzen der eingesetzten Veterinärwirkstoffe in den Böden der Feldversuche auf den Standorten AGD und WH für Raps, Mais, Mais (abgeerntet) und Winterweizen (Abb. 15, 16; Anhang Abb. 31, 32).

Dabei konnten für die Parzellen am Standort AGD die Wirkstoffe Paracetamol, Phenylbutazon und 3-PBA (Metabolit des Cypermethrins) nicht (mehr) detektiert werden, was offensichtlich einer sehr schnellen Metabolisierung inkl. Ab- und Umbauprozessen zuzuschreiben ist (Abb. 15, Anhang Abb. 31). Mit Ausnahme der Substanzen Ivermectin und Xylazin waren auffällige Wirkstoffeliminierungen in den jeweiligen Parzellenböden festzustellen. Bei Antipyrin und Cypermethrin konnten Parallelen in den Abbaukurven gefunden werden.



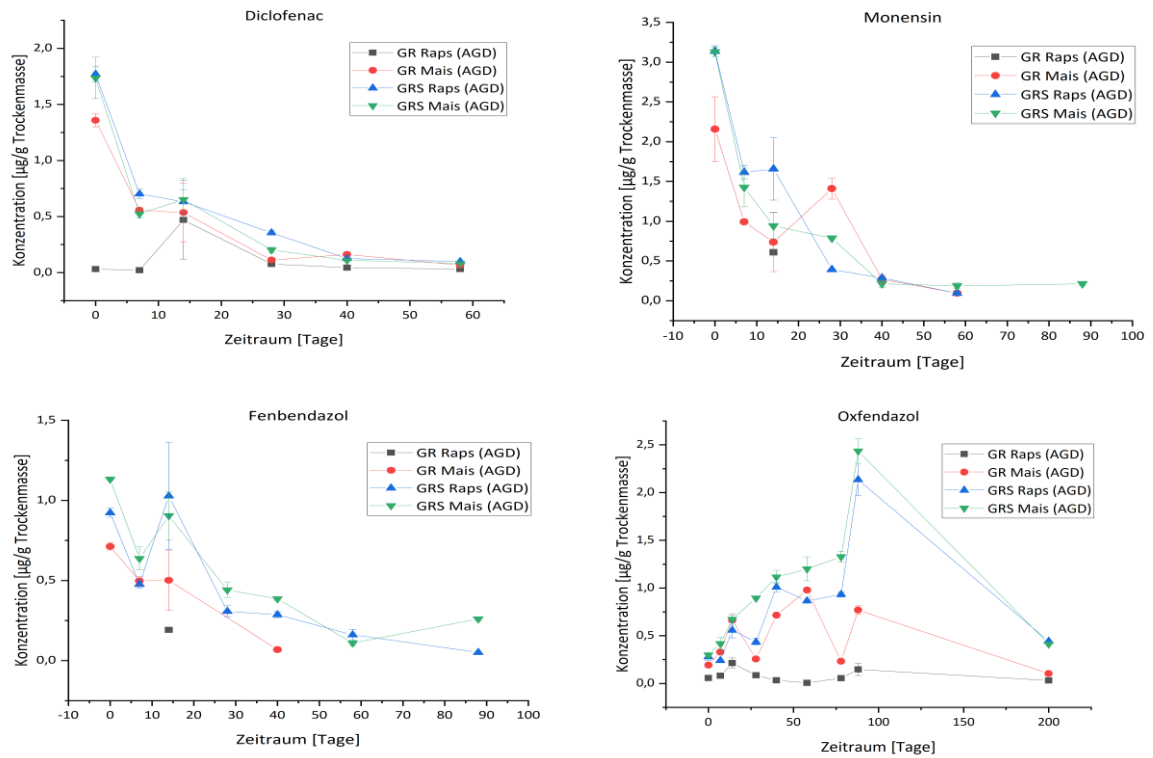
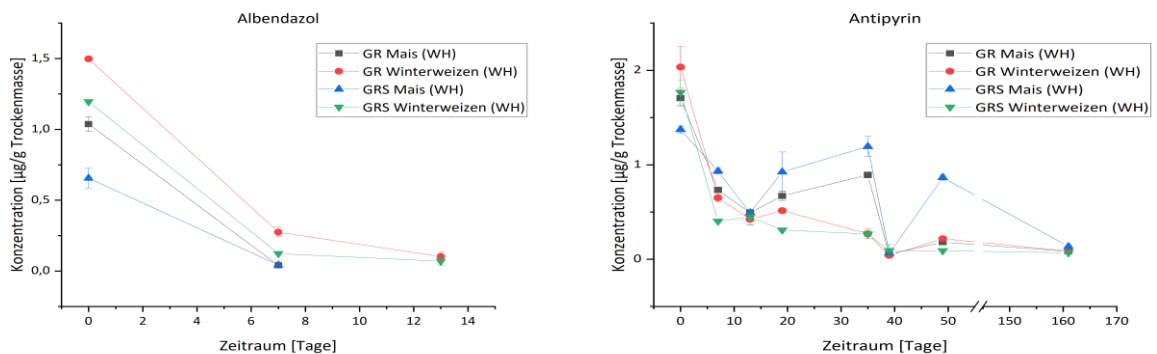


Abbildung 15: Ergebnisse der Feldversuche am Standort Diedorf (AGD); ausgewählt für Antipyrin, Cypermethrin, Diclofenac, Monensin, Fenbendazol, Oxfendazol (Metabolit)

Standort WH

Wie für die Böden am Standort AGD konnten für die Parzellen in WH die Wirkstoffe Paracetamol, Phenylbutazon und 3-PBA (Metabolit des Cypermethrins) nicht (mehr) nachgewiesen werden (Abb. 16, Anhang Abb. 32). Offensichtlich ist von sehr schnellen Metabolisierungs- bzw. Transformationsprozessen auszugehen. Mit Ausnahme der Substanzen Fenbendazol (für GRS), Ivermectin und Xylazin waren tendenziell deutlich sichtbare Wirkstoffreduzierungen in den jeweiligen Parzellenböden festzustellen. Die aufgetretenen Schwankungen in den Messwerten können im Zusammenhang mit Inhomogenitäten bei der Ausbringung und Verteilung der dotierten GR und daraus ableitbaren Akkumulierungen gesehen werden.



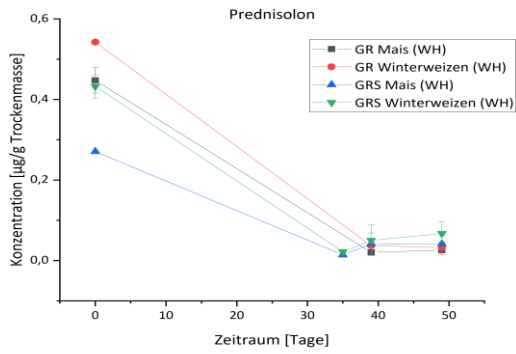
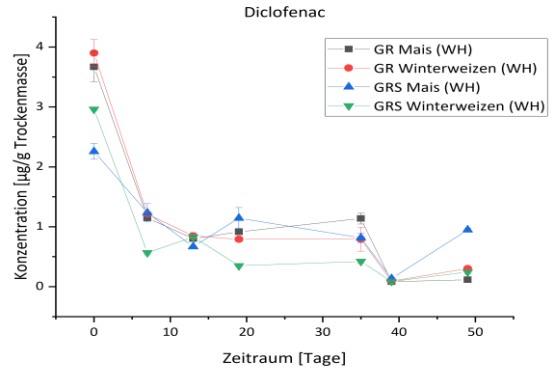
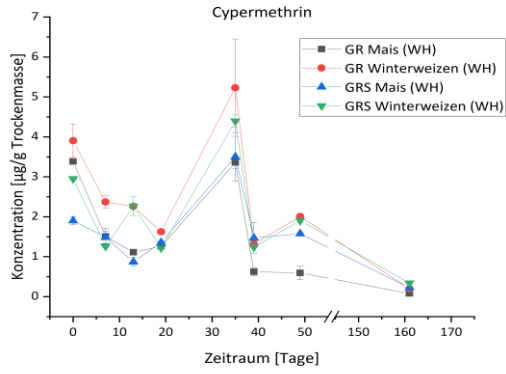


Abbildung 16: Ergebnisse der Feldversuche am Standort Westhasusen (WH); ausgewählt für Albendazol, Antipyrin, Cypermethrin, Diclofenac, Prednisolon

Pflanzenversuche



Abbildung 17: Kresse- und Gerstekulturen auf Kontrollerde (rechts), auf Substrat mit 5% GR (Mitte) bzw. 5% GR + Pharmaka (links)

Kresse- und Sommergerstekulturen wurden in Kleingefäßen auf Kontrollsubstrat sowie undotiertem und dotiertem Gärrest-Substrat-Gemisch angezogen (Abb. 17). Die Varianten mit dotiertem Gärrest zeigten gegenüber den Kontrollansätzen eine höhere Biomassebildung, was der Düngewirkung durch den anteiligen GR zuzuschreiben ist.

Das nachfolgende Diagramm stellt die gemessenen Gehalte an Wirkstoffen in den Substratmatrices bzw. Kresse- und

Sommergerstepflanzen nach vier Wochen Kultur gegenüber (Abb. 18). Die Untersuchungen zeigten, dass Prednisolon in erhöhter Konzentration von den Kresse- und insbesondere Gerstepflanzen angereichert wurde, während Monensin nur durch die Kresse in quantifizierbarer Form aufgenommen wurde. Die übrigen Wirkstoffe wurden anteilig nur gering oder nicht nachweisbar akkumuliert. Cypermethrin war in den Matrices stark angereichert, Prednisolon vor allem in der Gerste-Matrix. Auch Ox fendazol (Metabolit des Fenbendazol), Xylazin und Monensin konnten in den Matrices auffällig nachgewiesen werden. Hinsichtlich des Wiederfindungsverhaltens der einzelnen Wirkstoffe sind u.a. Abbau- und Metabolisierungsprozesse, Adsorptions- und Konjugatbildungsprozesse in den Matrices bzw. im Pflanzenmaterial zu sehen.

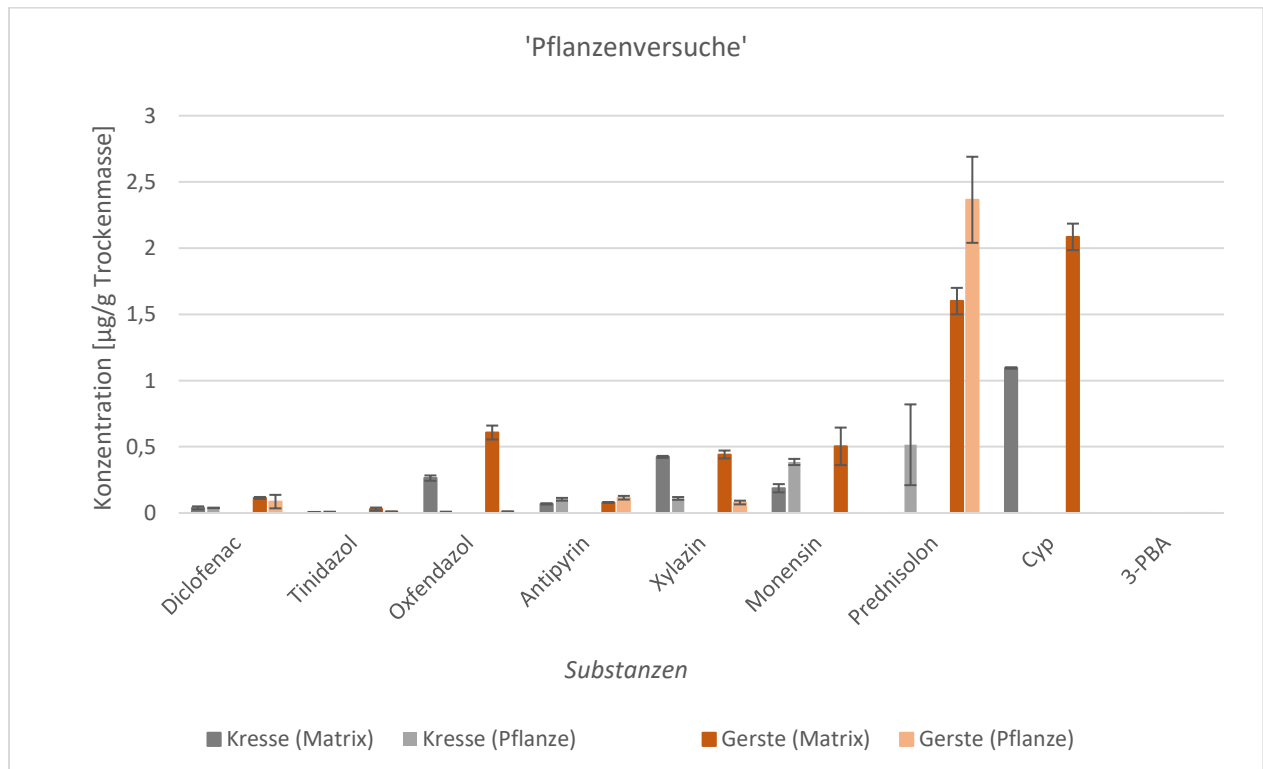


Abbildung 18: Pharmakagehalte in der Substratmatrix bzw. im Pflanzenmaterial nach vier Wochen Kultur

Kleintechnische Versuche - ‚Miststapel‘

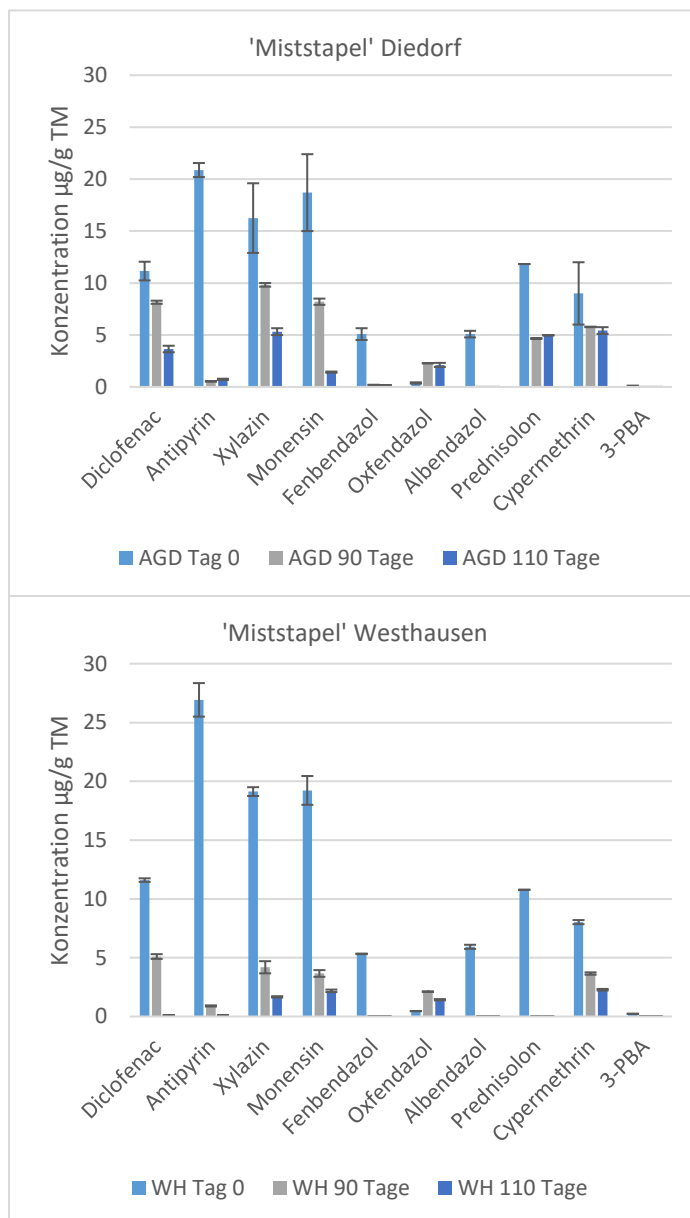


Abbildung 19: Vergleichende Darstellung der Veterinärpharmakakonzentrationen bei der Miststapelung nach 110 Tagen (Winter)

In *Abbildung 19* sind die Abbauergebnisse aus den kleintechnischen Versuchen (‚Säckchenversuche‘) für die Standorte AGD und WH dargestellt (Abb. 19). Für beide Versuchsansätze zeigten sich hinsichtlich der eingesetzten Veterinärpharmaka ein ähnliches Abbauverhalten. Innerhalb von 110 Tagen (unter Winterbedingungen) wurden die Substanzen an beiden Standorten nahezu vollständig reduziert (Albendazol, Antipyrin, Fenbendazol). Diclofenac, Prednisolon und Xylazin wurden in WH gegenüber AGD besser eliminiert. Bei Fenbendazol und Cypermethrin zeigten sich nach 110 Tagen Rückstände beim Metaboliten mit Abbautendenz (Oxfendazol) bzw. ein weiterer Abbau des Metaboliten 3-PBA (*Chen et al. 2012*).

Die Versuche zeigen einerseits, dass Veterinärpharmaka über die „Miststapelung“ selbst unter Winterbedingungen eliminiert werden können sowie andererseits den Einfluss der Lagerzeit, der nach vier bis sechs Monaten weitere Abbautendenzen erwarten lässt.

Die insgesamt besseren Abbauergebnisse für WH gegenüber AGD können mit unterschiedlichen Reifegraden der Mistfraktionen und den daraus resultierenden mikrobiellen Aktivitäten, aber auch den eingesetzten (dotierten) GR-Matrices zusammenhängen.

Die Wirkstoffe Albendazol, Antipyrin, Diclofenac, Fenbendazol und Prednisolon können (zumindest für WH) als sehr gut eliminierbar eingeschätzt werden. Substanzen wie Cypermethrin, Monensin und Xylazin sind offensichtlich unter Bedingungen der ‚Miststapelung‘ schwerer abbaubar. Der Zeitfaktor, aber vor allem weitere wissenschaftliche Erkenntnisse zur Metabolisierung und Bildung von Transformationsprodukten der verschiedenen Substanzen sind in diesem Zusammenhang bedeutsam.

Vererdung von Gärrest

Die ersten Versuche zur Vererdung von Gärrest zeigen nach sechs Monaten eine erhebliche Reduzierung der Volumina, wobei die entstehende Sickerwassermenge bei Gärrest mit Zuschlägen etwa ein Drittel der des Gärrests ohne Beimengungen betrug (Abb. 20). Die Volumenreduzierung betrug im ersten Fall 47 %, im Behälter mit GR und Zuschlägen ca. 38 %. Die Verdunstung von Wasseranteilen ist dabei als wesentlicher Prozess zu sehen. Eine Fortsetzung ist im Rahmen von ABIOTEC II vorgesehen, da der Vererdungsprozess noch nicht abgeschlossen ist. Weitere, insbesondere auch stoffliche Betrachtungen sollen ergänzend mitgeführt werden. Ziel muss dabei auch sein, das austretende Sickerwasser auf ein Minimum zu reduzieren.



Abbildung 20: Vererdungsbehälter mit GR nach sechs Monaten; Vererdungsbehälter mit GR und Zuschlägen nach 6 Monaten

Die besondere Herausforderung für künftige Untersuchungen liegt darin, die kleintechnischen Versuche zur Vererdung in den Maßstab des Agrarbetriebes zu überführen, wobei Fragen der Kosteneffizienz und Praktikabilität im Vordergrund stehen müssen. Die Reduzierung des betriebseigenen Flüssigdüngers über Maßnahmen der Vererdung und Entwässerung könnten den Landwirten zusätzliche Ausbringoptionen im Rahmen der seit 2017 enger gefassten Düngemittelverordnung ermöglichen. Die dabei einhergehende qualitative Verbesserung des Substrates hin zu einem höherwertigen Feststoffdünger stellt einen wesentlichen Nebeneffekt des Verfahrens dar.

Mikrobiologische Untersuchungen



Abbildung 21: Bakterien- und Pilzkulturen auf Nähragarplatten

Ein begleitender Effekt der Ausbringung von veterinärmedizinisch relevanten Pharmaka bzw. Wirkstoffen im Wirtschaftsdünger ist die Veränderung der mikrobiellen Bodenflora (Abb. 21). Dabei sind sowohl unmittelbare Effekte auf die Organismendichte und Artenzusammensetzung, als auch hygienische Fragestellungen, sowie Prozesse von Anpassungen und Resistenzen gegen die Wirkstoffe zu erwarten und auch belegt (Barra Caracciolo et al. 2015).

Die unmittelbaren Auswirkungen sind je nach Ausbringung lokal und temporär beschränkt. Bodenmikroben leisten andererseits einen Beitrag zum Abbau und zur Metabolisierung der Stoffe und werden als Faktoren gegen Stress bei Kulturpflanzen diskutiert (Kumar und Verma 2018; Majeed et al. 2018). Deshalb war die Untersuchung der mikrobiellen Bodenflora ein wichtiger begleitender Aspekt. Abhängig von der vorausgegangenen Behandlung der Wirtschaftsdünger ist der Eintrag und die Persistenz sowohl von wachstumsfördernden als auch hygienisch bedenklichen Mikroorganismen möglich (Qi et al. 2019).

Die Durchführung der Labor- und Feldversuche ermöglichte die vergleichende Analyse von Indikator-Parametern der Mikroflora im Boden. In Wirtschaftsdüngern (Gärrest) und Böden, jeweils mit und ohne zusätzliche Dotierung, konnten kultivierbare Mikroorganismen untersucht werden. Als primäres Kriterium wurde die Gesamtmenge an mesophilen Bakterien in aerober und anaerober Kultur bestimmt. Weiterhin wurden Pilze semiquantitativ als vermehrungsfähige Bestandteile (Sporen, Mycelteile) und nach ausgewählten Gruppen auf unterschiedlichen taxonomischen Stufen erfasst.

Die bakterielle Gesamtkeimzahl betrug in den Proben von Wirtschaftsdünger, Böden mit und ohne Düngung im Mittel 5×10^7 Koloniebildende Einheiten pro Gramm Frischsubstanz (KbE/g) bei einer Schwankung von \pm einer logarithmischen Stufe (log-Stufe).

Laborversuche

In Laborversuchen wurden die Proben zu Zeitpunkten entsprechend der Freilandversuche entnommen. Somit sind gleiche Zeiträume, jedoch abweichend keine jahreszeitlich bedingten Einflüsse anzunehmen. Die Proben von Ausgangsmaterial wiesen insgesamt geringere Keimzahlen auf als die Mischungen mit Gärrest und/oder Stroh (Abb. 22).

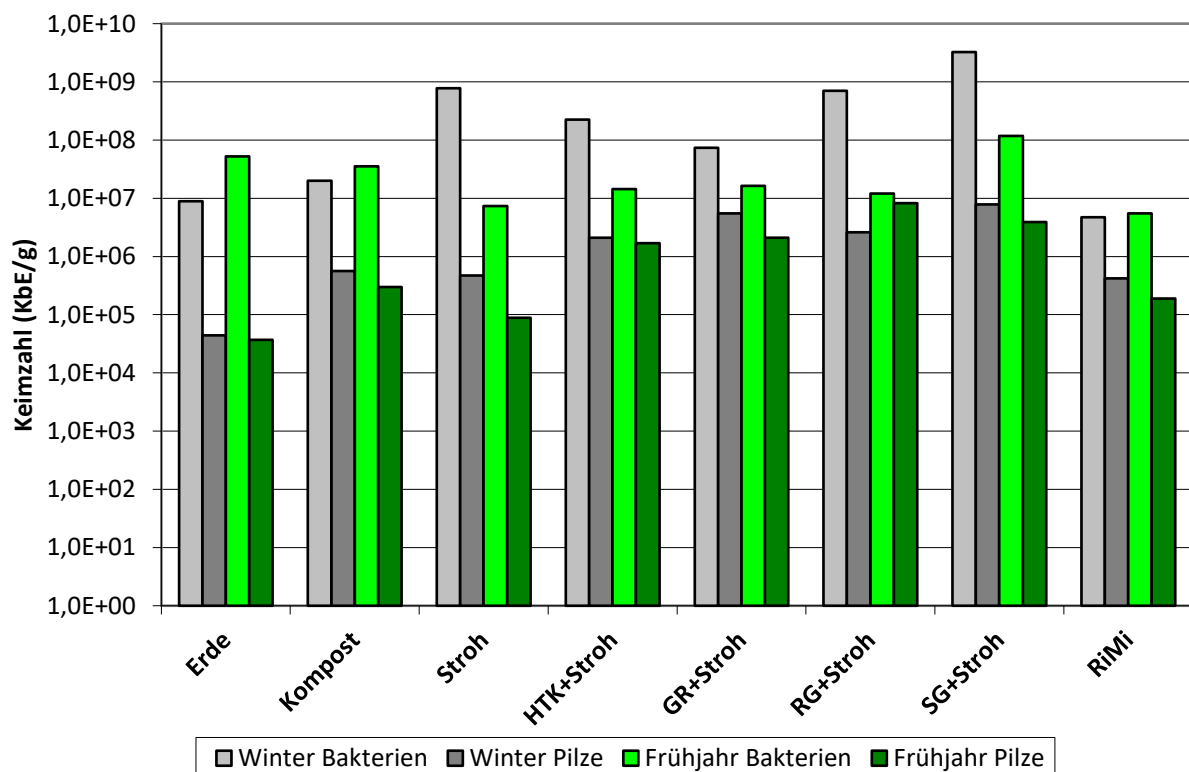


Abbildung 22: Laborversuche, Gesamtkeimzahlen Bakterien und Pilze

Die Keimzahlen für Pilze lagen zu Beginn der Experimente um 1,5 - 2 log-Stufen unter denen der Bakterien, nach mehrmonatigem Wachstum, insbesondere unter Zugabe von zusätzlichem organischen Material als Stroh erhöhte sich der relative Keimgehalt an Pilzen sowie deren relative Zusammensetzung, bezogen auf die häufigsten nachgewiesenen Gruppen (Gattungen und höhere Ordnungen).

Dabei ergab sich ein durchgängig dominierendes Vorkommen von undifferenzierten sterilen Mycelien und schnellwachsenden Zygomyceten. In den Proben mit Strohzusatz wurden große Anteile von *Trichoderma* sp. gefunden (Tab. 13).

Tabelle 13: Verteilung der Pilzgruppen in verschiedenen Pharmaka-dotierten Substraten

Substrat	Pilzgruppen nach relativer Häufigkeit			
Erde	Steriles Mycel	Zygomyceten		
Kompost	Steriles Mycel	Penicillium	Aspergillus	
Stroh	Zygomyceten			
HTK+ Stroh	Zygomyceten	Aspergillus		
GR + Stroh	Steriles Mycel	Trichoderma	Penicillium	Zygomyceten
RG + Stroh	Trichoderma	Botrytis		
SG + Stroh	Trichoderma	Penicillium	Botrytis	Steriles Mycel
Rindermist	Steriles Mycel	Penicillium	Botrytis	

Feldversuche

Feldversuche wurden an zwei Standorten durchgeführt. Auf vergleichbaren Böden und klimatischen Bedingungen bei Bestellung mit unterschiedlichen Nutzpflanzen waren hinsichtlich der Keimzahlen wie auch des Artenspektrums keine erheblichen Unterschiede zu verzeichnen.

Ausgewählte human-/veterinärmedizinisch und phytopathologisch relevante Gruppen von Bakterien (*Enterobacteriaceae* - *Escherichia coli* und fäkalcoliforme Keime-, Enterokokken, Pseudomonaden, Staphylokokken, Clostridien) konnten in sämtlichen Proben lediglich sporadisch nachgewiesen werden.

Am Standort Diedorf (mit Raps und Mais) war eine Tendenz insoweit erkennbar, dass die bakterielle Gesamtzahl im Winter und zeitigen Frühjahr in den gedüngten Bodenproben um den Faktor 6 bis 15 niedriger lag als im Herbst. Die Werte in ungedüngten Böden liegen hingegen im Winter und Frühjahr über denen vom Herbst (Tab. 14, Abb. 23).

Diese Relationen waren gleichermaßen am Standort Westhausen (mit Mais und Weizen) festzustellen. Hier konnte die Verringerung der Gesamtkeimzahl um den Faktor bis zu 40 noch deutlicher aufgezeigt werden (Tab. 16, Abb. 24).

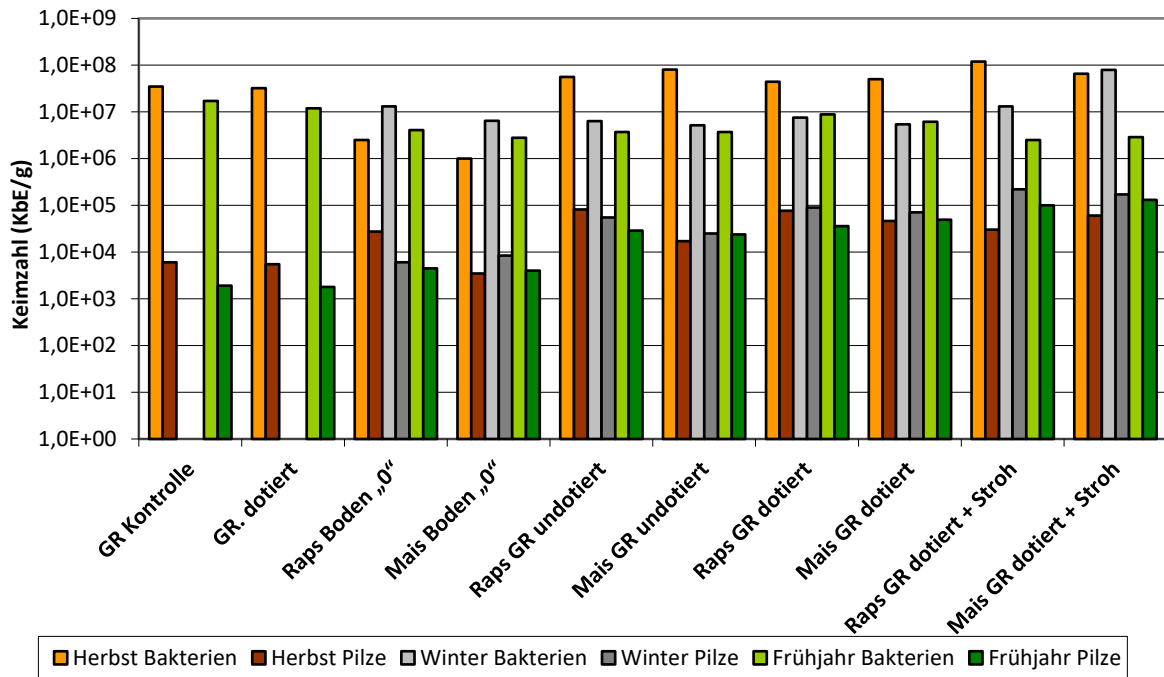


Abbildung 23: Feldversuche AGD, Gesamtzahlen Bakterien und Pilze

Tabelle 14: Mikrobielle Matrixuntersuchung der Feldversuche AGD, Gesamtzahlen Bakterien (KbE/g)

Feldversuche AGD (Diedorf)			
Substrat	Herbst	Winter	Frühjahr
GR undotiert	3,50E+07		1,70E+07
GR. dotiert	3,20E+07		1,20E+07
Raps			
Boden „0“	2,50E+06	1,30E+07	4,10E+06
GR undotiert	5,60E+07	6,30E+06	3,70E+06
GR dotiert	4,40E+07	7,50E+06	8,80E+06
Gr dot + Str	1,20E+08	1,30E+07	2,50E+06
Mais			
Boden „0“	1,00E+06	6,40E+06	2,80E+06
Raps GR undotiert	8,10E+07	5,20E+06	3,70E+06
GR dotiert	5,00E+07	5,40E+06	6,10E+06
GR dot + Str	6,60E+07	7,90E+07	2,90E+06

Tabelle 15: Verteilung der Pilzgruppen (AGD)

Substrat	Pilzgruppen nach relativer Häufigkeit			
GR Kontrolle	Steriles Mycel		Actinomyceten	
GR dotiert	Steriles Mycel	Cladosporium	Actinomyceten	
Boden (Raps/ Mais)	Steriles Mycel		Aspergillus	
GR undotiert	Zygomyceten	Cladosporium	Aspergillus	Fusarium
GR dotiert	Zygomyceten	Steriles Mycel	Penicillium	Aspergillus
GR dotiert mit Stroh	Trichoderma	Zygomyceten	Steriles Mycel	

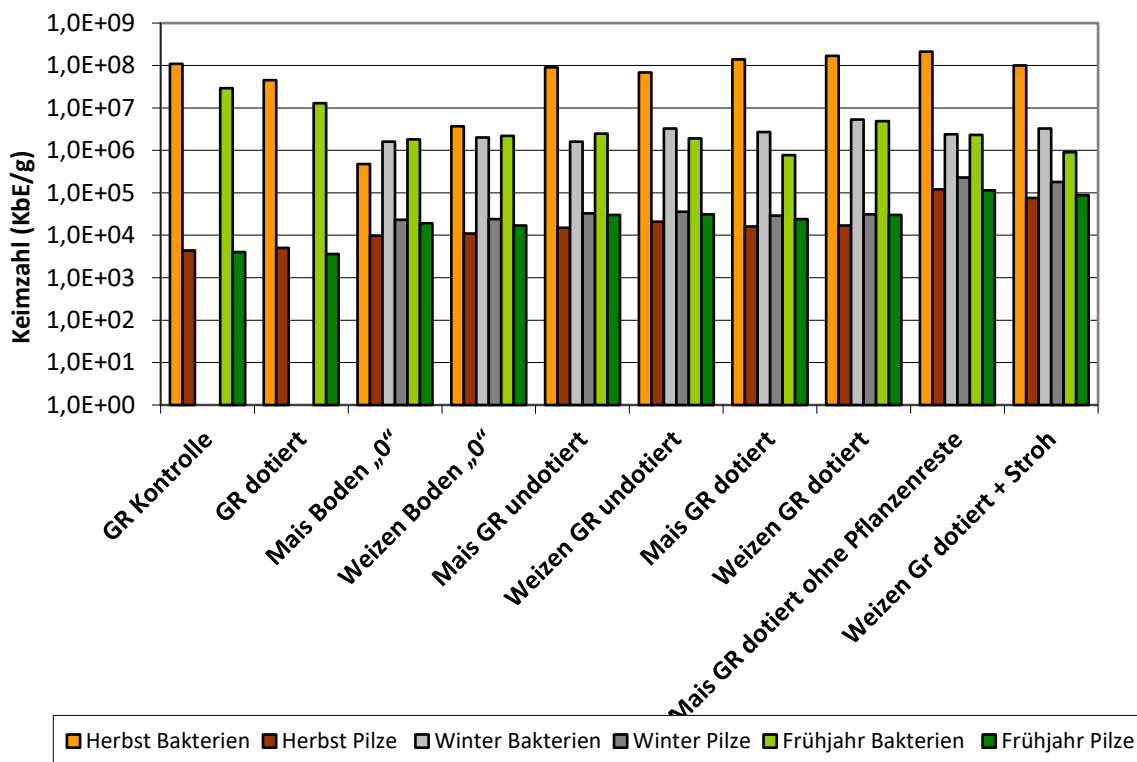


Abbildung 24: Feldversuche WH, Gesamtzahlen Bakterien und Pilze

Tabelle 16: Mikrobielle Matrixuntersuchung der Feldversuche WH, Gesamtmenge Bakterien (KbE/g)

Feldversuche WH (Westhausen)				
	Substrat	Herbst	Winter	Frühjahr
	GR Kontrolle	1,10E+08		2,90E+07
	GR. dotiert	4,50E+07		1,30E+07
Mais	Boden „0“	4,80E+05	1,60E+06	1,80E+06
	GR undotiert	9,00E+07	1,60E+06	2,50E+06
	GR dotiert	1,40E+08	2,70E+06	7,80E+05
	Gr dot + Str	2,10E+08	2,40E+06	2,30E+06
Weizen	Boden „0“	3,70E+06	2,00E+06	2,20E+06
	GR undotiert.	6,80E+07	3,30E+06	1,90E+06
	GR dotiert	1,70E+08	5,30E+06	4,90E+06
	Gr dot + Str	1,00E+08	3,30E+06	9,00E+05

Tabelle 17: Verteilung der Pilzgruppen (WH)

Substrat	Pilzgruppen nach relativer Häufigkeit			
GR Kontrolle	Steriles Mycel			
GR dotiert	Steriles Mycel	Cladosporium		
Boden (Mais/Weizen)	Steriles Mycel	Cladosporium	Fusarium	
GR undotiert	Zygomyceten	Cladosporium	Penicillium	Fusarium
GR dotiert	Zygomyceten	Steriles Mycel	Penicillium	
GR dotiert mit Stroh	Trichoderma	Zygomyceten	Steriles Mycel	

Die Art der Bestellung der Felder (Mais oder Raps) war ohne sichtbaren Einfluss. Die Dotierung der Gärreste zeigt ebenso wenig wie die Zugabe von Stroh wesentliche Unterschiede im Ausgangsmaterial und für die im Boden stattfindenden Wachstums- und Vermehrungsprozesse.

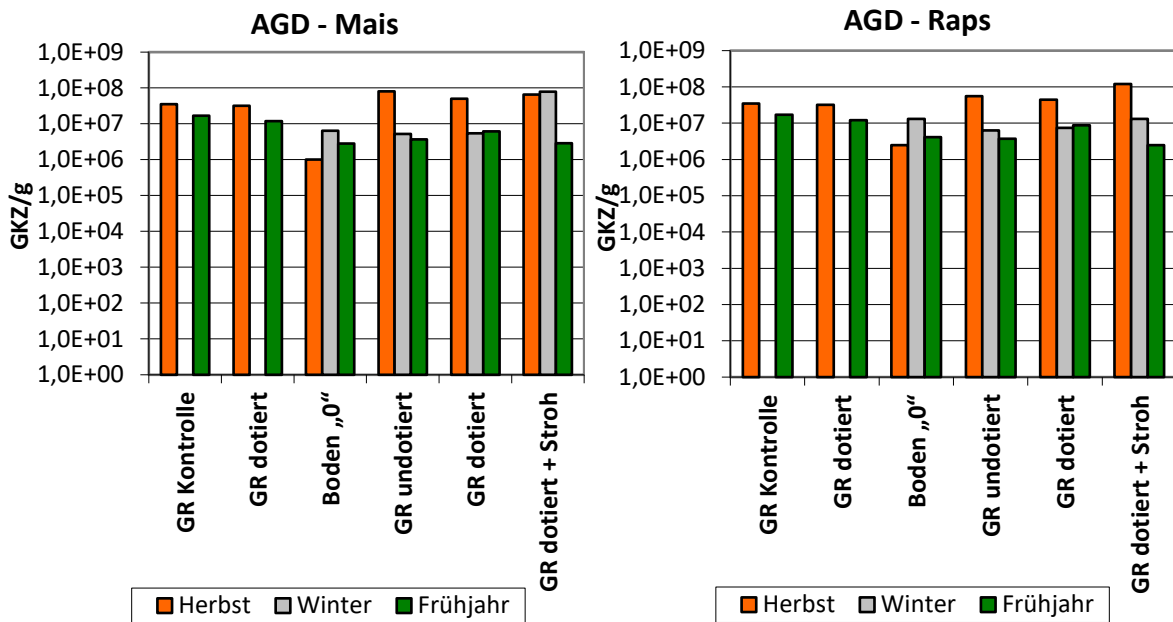


Abbildung 25: Mikrobielle Untersuchung des Pflanzenmaterials der Feldversuche AGD, Gesamtzahlen Bakterien (GKZ/g)

Säckchenproben aus Miststapelung

Die Einbringung von abgegrenzten Proben („Säckchen“) ergab unabhängig vom Standort und der Dotierung im Winter und Frühjahr keine deutlichen Veränderungen der Gesamtkeimzahl. (Abb. 26).

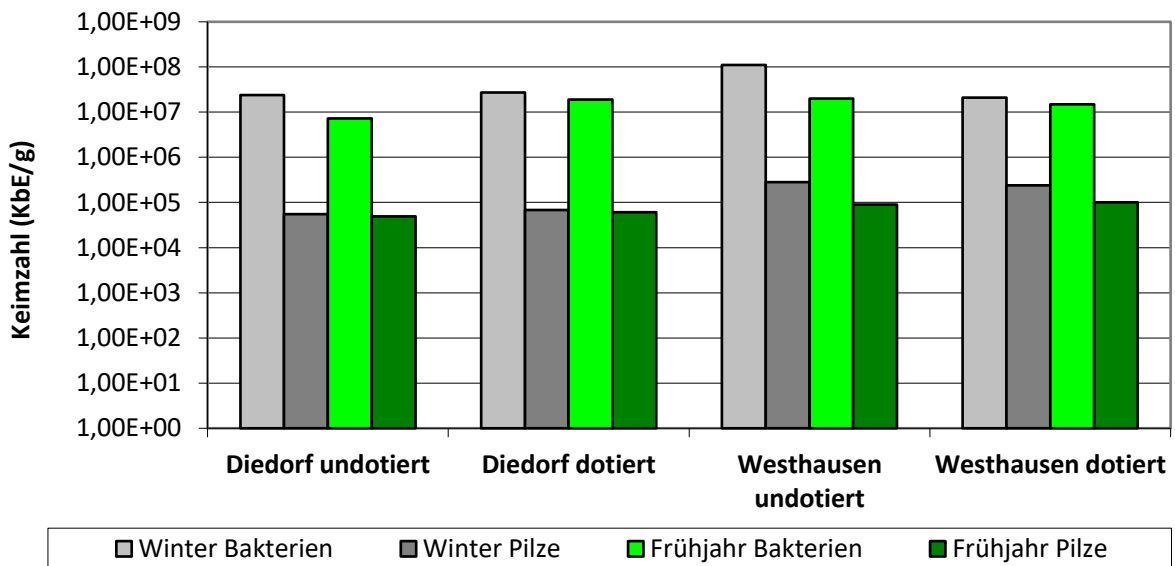
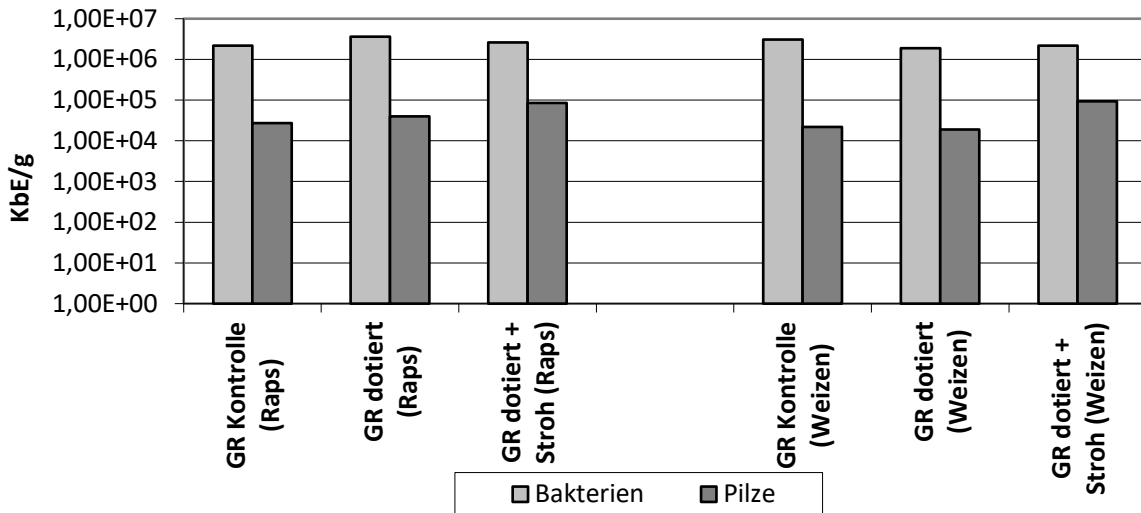


Abbildung 26: Gesamtzahlen Bakterien und Pilze in Miststapelversuchen an den Standorten AGD und WH

Rhizosphärenuntersuchung

Im Bereich der unmittelbaren Wurzelumgebung, der als Rhizosphäre hinsichtlich der Stoffaufnahme und Pflanzenernährung besonders bedeutsamen Zone, wurden sowohl bei Raps als auch bei Weizen keine wesentlichen Veränderungen der Gesamtkeimzahlen festgestellt (Abb. 27). In den Varianten mit Stroh waren die Anteile der Pilze erhöht, wobei die Gattung *Trichoderma spec.* auffällig war.



Substrat	Bakterien	Pilze
Raps		
GR undotiert.	2,20E+06	2,70E+04
GR dotiert	3,60E+06	4,00E+04
Gr dot + Str	2,60E+06	8,50E+04
Weizen		
GR undotiert.	3,10E+06	2,20E+04
GR dotiert	1,90E+06	1,90E+04
Gr dot + Str	2,20E+06	9,30E+04

Abbildung 27: Keimzahlen im Rhizosphärenbereich

Tabelle 18: Verteilung der Pilzgruppen im Rhizosphärenbereich

Substrat	Pilzgruppen nach relativer Häufigkeit, inkl. „Strahlenpilze“			
GR Kontrolle	Steriles Mycel	Zygomyceten	Actinomyceten	
GR dotiert	Steriles Mycel	Cladosporium	Actinomyceten	
GR dotiert mit Stroh	Steriles Mycel	Trichoderma	Steriles Mycel	Fusarium

Die Ausbringung von Wirtschaftsdüngern mit darin enthaltenen Xenobiotika lässt Wechselwirkungen mit der autochthonen Mikroflora des Bodens in mehrerer Hinsicht erwarten. Die Wirtschaftsdünger enthalten je nach Herkunft und vorheriger Behandlung eine eigene Mikroflora, die sich von der des Bodens unterscheiden kann. Sie hat insbesondere nach einer Biogasvergärung eine Selektion durchlaufen. Die Frage, inwieweit sich die hier dominierenden Arten in der Bodenumgebung, unter den herrschenden abiotischen Bedingungen und denen der Biozönose behaupten und damit die Zusammensetzung der Bodenflora verändern können, stand am Beginn des Projekts.

Die Gesamtzahl der mesophilen Bakterien war in den verschiedenen Böden, sowohl an zwei Standorten als auch bei verschiedenen Nutzpflanzenkulturen vergleichbar. In den ausgebrachten Gärresten und dem Agrarboden sind die Konzentrationen der Mikroorganismen im Mittel nicht unterschiedlich. Dies gilt sowohl für Proben bei erstmaliger Ausbringung als auch zu den folgenden Zeitpunkten. Eine solche größere Stabilität der Bodenmikroflora verglichen mit jener in anderen Substraten konstatieren auch komparable wissenschaftliche Publikationen (*Łukaszewicz et al. 2017*). Da auch die Menge des eingebrachten Düngers gegenüber dem Bodenvolumen relativ gering war, konnte keine unmittelbare Erhöhung des Keimgehaltes an der Oberfläche wie auch in tieferen Schichten des Bodens beobachtet werden.

Eine Abhängigkeit der weiteren Wachstumsentwicklung von den Jahreszeiten konnte in allen Versuchen beobachtet werden. Im Winter und Frühjahr waren die Wachstumsraten auch der „eingebrachten“ Mikroorganismen geringer, während im Herbst am Ende der Vegetationsperiode ein besseres Wachstum wegen der höheren Temperaturen im vorangegangenen Zeitraum zu erwarten war.

Die Untersuchungen der Bereiche in unmittelbarer Umgebung der Wurzel lassen verstärkte Effekte auf das Wachstum der Pflanzen erwarten (*Köberl et al. 2013*). Inwiefern der fehlende Nachweis einer Förderung auf dem Niveau der unspezialisierten Bakterienflora auf den vorläufig stichprobenartigen Untersuchungsumfang zurückgeht, sollte in weiteren Experimenten geklärt werden.

Die Behandlung der Wirtschaftsdünger bei der Biogasvergärung führte zu einer weitgehenden Hygienisierung des Materials. Die betrachteten Indikator-Gruppen Fäkalcoliforme, *E. coli*, Enterokokken, *Aspergillus* spp. und *Fusarium* spp. waren in den ausgebrachten Materialien nicht in erhöhten Konzentrationen nachweisbar. Die Untersuchung der anaeroben Mikroflora ergab einen geringeren Anteil dieser Gruppen. Die gut durchlüfteten Bodenstrukturen erlaubten nur partiell Bereiche mit anaeroben Bedingungen und daher nur einen Nachweis obligater Anaerobier in geringen Zahlen. *Clostridium* spp. als hygienerelevante Gattung wurde in keiner Probe gefunden. Die Hygienisierung in der Biogasvergärung war auch hinsichtlich eines längerfristigen Ausschlusses wirksam.

Die Ergebnisse lassen nicht auf dauerhafte Effekte schließen. Eine generelle Sicherheit besteht wegen der variablen Ausgangssituation jedoch nicht (*Sahlström 2003; Guebitz et al. 2015, S. 63–99*).

Die in Wirtschaftsdünger enthaltenen Xenobiotika, (Pharmaka sowie deren Ab- /Umbauprodukte) stellten einen möglichen Stress für Pflanzen und die Mikroflora des Bodens dar. Schädigende oder förderliche Effekte sollten sich in einem insgesamt veränderten Wachstum und /oder einer selektiven Hemmung oder Förderung einzelner Arten und damit einer Veränderung des Spektrums zeigen.

Beides war nicht der Fall: Sowohl in den Laborversuchen als auch auf den Agrarflächen beider Standorte und mit Bewuchs von Raps oder Mais wurden keine in der Tendenz veränderten bakteriellen Keimzahlen gemessen. Das Wachstum von Pilzen war auf gleichbleibend niedrigerem Niveau ebenfalls nicht deutlich verändert. Die Dominanz der jeweiligen Gruppen wurde nicht verändert.

Hygienerelevante Gruppen von Bakterien oder Pilzen traten nicht in verstärktem Maße auf. Eine Besonderheit bildete die Einbringung von zusätzlichem organischen Material als Stroh. Dabei wurde das Auftreten von *Trichoderma* spp. gefördert. Diese Gattung von Pilzen ist wegen ihrer möglichen Effekte zur Wachstumsförderung und Verbesserung der Widerstandskraft von Kulturpflanzen von besonderem Interesse (*Brotman et al. 2010; Kashyap et al. 2017*).

Aus mikrobiologischer Sicht geben die vorliegenden Ergebnisse damit auch keine Hinweise auf spezifisch nachteilige Beeinflussungen der Bodenmikroflora durch Wirtschaftsdünger, die Rückstände von pharmazeutischen Wirkstoffen enthielten. Die autochthone Flora erwies sich als weitestgehend stabil.

Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen

Die Betrachtungen zur Wirtschaftlichkeit verschiedener praxisrelevanter Maßnahmen zur Behandlung von Wirtschaftsdünger mit Blick auf einen Abbau relevanter, nicht-antibiotischer Pharmaka können in ähnlicher Weise wie im Projekt Abiotec (hier Prof. Dr.- Ing. F. Scholwin, IBKE Weimar) angesetzt und ergänzt werden.

Ausgehend von den Analysen zum Abbau von Antibiotika unter verschiedenen, für die Praxis geeigneten Bedingungen hat sich herauskristallisiert, dass die nachfolgend beschriebene Methode der aeroben 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 beispielhaft für verschiedene Exkrementarten eine sehr grobe Wirtschaftlichkeitsberechnung durchgeführt (Tab. 19 und 20).

Tabelle 19: Technische Charakterisierung der Behandlung von Exkrementen am Beispiel einer einheitlichen Menge von 100 t (nach Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL), 2014 (Horlacher et al. 2014))

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 Strohannteil (Exkreme werden 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 20: Ökonomische Auswertung der Behandlung von Exkrementen am Beispiel einer einheitlichen Menge von 100 t (nach Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL), 2014 (Horlacher et al. 2014))

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 Veterinärpharmaka 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/Monat für eine 8.000-Liter-Milchkuh Behandlungskosten von 321 € pro Kuh bzw. 4 ct/Liter Milch (Horlacher et al. 2014). 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 Pharmakaausbringung bewirkt. Die Analyse zeigt aber auch, dass Mehrkosten, die durch den Verzicht auf Pharmaka, z.B. durch geringere Milch- oder Fleischleistung entstehen, mit großer Sicherheit vorteilhaft gegenüber nachgelagerten Maßnahmen zur Behandlung von Exkrementen sind.

Weitergehende Maßnahmen zur Vererdung (bei erheblicher Reduktion der Wassergehalte) von idealer Weise stabilisiertem Gärrest oder ggf. Gülle - wobei hier das Problem der Nährstoffstabilisierung weiterhin besteht - in offenen, aber intensiv mit Stroh abgedeckten Becken, Lagunen oder ehemaligen Silobereichen könnte die ursprünglichen Kosten für die Ausbringung der Flüssigdünger reduzieren, ist aber durch zusätzliche Aufwendungen bei ihrer Realisierung gekennzeichnet. Diese wären allerdings durch den Agrarbetrieb selbst umsetzbar. In diesem Zusammenhang sind weitere praktische Untersuchungen und darauf aufbauende Kalkulationen notwendig, die die bessere Bodenverträglichkeit des „vererdeten“ Wirtschaftsdüngers und die deutlich geringeren Nährstoffverluste berücksichtigen muss.

Bei einer einfachen Miststapelung (Festmist ohne weiteres Umsetzen) oder aber direktem Tretmist dagegen reduzieren sich die Kosten auf nahe Null. Dies sollte mit Blick auf ein nachfolgendes Projekt - wie auch bereits im Rahmen von ABIOTEC II - eine entscheidende forschungsseitige, aber insbesondere auch wirtschaftliche Orientierung und Ausrichtung vorzeichnen.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Entwicklung einer geeigneten und robusten HPLC-MS-Messmethode zum Nachweis nicht-antibiotischer Wirkstoffe war ein Schwerpunkt der Arbeiten im Projekt AMEDITEC an der MFPA Weimar. Neben Recherchen zu aktuellen analytischen bzw. messmethodischen Entwicklungen waren umfangreiche Recherchen zu den relevanten nicht-antibiotischen Pharmaka, ihren Metaboliten und Transformationsprodukten sowie zu relevanten Energie- und Rohstoffpflanzen notwendig. Hierzu konnten Befragungen und Gespräche mit Behörden, Tierärzten und Agrarbetrieben zum Einsatz der Pharmaka in der Tierhaltung zielführend umgesetzt werden. Neben der umfangreichen Beschaffung von Referenzmaterial führten die Arbeiten zu einer den weiteren Projektzielen angepassten, selektiven und ausreichend sensitiven Screeningmethode. Des Weiteren konnten hinsichtlich der Entwicklung eines neuartigen agrobiotechnologischen Verfahrens technische Ansätze und Experimente zu Abbauprozessen in Düngematrixen im labor- und kleintechnischen Maßstab erfolgreich erfolgen. Diese stehen im Rahmen einer Erweiterung auf den halbtechnischen Maßstab zur Verfügung.

Qualitative und quantitative Untersuchungen zur kultivierbaren mikrobiellen Besiedlung von Bodenmaterialien und Wirtschaftsdünger hinsichtlich der Entwicklung einer Prüfroutine zur Beurteilung pharmakologischer Effekte wurden vom IUML Erfurt erfolgreich durchgeführt. Dabei spielte die Erarbeitung von Aufbereitungsverfahren in Abhängigkeit von Konsistenz und Wassergehalt der Proben eine wichtige Rolle. Es konnten Voraussetzungen für eine fortlaufende Prüfung des resultierenden Eintrags von Pharmaka in die Umwelt erarbeitet werden. Aus mikrobiologischer Sicht zeigen die vorliegenden Ergebnisse keine spezifisch nachteiligen Beeinflussungen der Bodenmikroflora durch Wirtschaftsdünger, die Rückstände von veterinärpharmazeutischen Wirkstoffen enthielten. Die autochthone Bodenflora erwies sich als weitestgehend stabil. Ähnliche Befunde zeigen auch vergleichbare Untersuchungen (Kaczala und Blum 2016).

Die Methodenentwicklung im Rahmen des Nachweises der nicht-antibiotischen Wirkstoffe 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. 14 verschiedene Substanzen der verschiedenen Wirkstoffgruppen 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 bearbeitet werden und sollte in einem nachfolgenden Projekt eine größere Rolle spielen (Huang et al. 2018). Eine Abbaubilanzierung der Pharmaka kann auf diese Weise durch Input- und Output-Messungen erfolgen.

Die Agrarbetriebe stellten den Wirtschaftsdünger (Gülle, Gärrest, Urin) bereit und waren beratend projektintegriert sowie permanent an den Fortgang des Projektes angeschlossen und informiert, was sich als sehr förderlich und wichtig für den Projektverlauf erwies. Ihre Mitarbeit und Unterstützung bei der Durchführung der Versuche war für den Erfolg des Projekts entscheidend. So war beispielsweise die Gewinnung von Katheter-Urin separierter Rinder, um die Wirkstoffe nach Tierpassage untersuchen zu können, nur durch die betriebliche und veterinärmedizinische Unterstützung vor Ort möglich.

Die Umsetzung des auch ökologisch ausgerichteten Projekts fördert die Entwicklung und Etablierung innovativer „low tech“- und „low cost“- Verfahrensansätze zum Abbau von Veterinärpharmaka in Wirtschaftsdünger im Sinne ihrer Überführung in den Pilotmaßstab, und stellt eine reproduzierbare und sichere Analytik bereit.

Die nachfolgend genannten Thesen und Erkenntnisse aus AMEDITEC, ggf. bestätigt in der nationalen und internationalen Literatur, unterstreichen die Bedeutung und Sinnhaftigkeit weiterer Forschungs- bzw. fortführender Projektarbeiten:

- Zahlreiche veterinärmedizinische (nicht-antibiotische) Pharmaka, die therapeutisch bei Nutztieren zum Einsatz kommen, werden in die verschiedenen Umweltkompartimente freigesetzt. Dort können sie, ihre Konjugate oder Metaboliten über längere Zeiträume verbleiben (*Hannappel et al. 2014b*).
- Pharmazeutische Substanzen werden durch Erosion und Versickerung von landwirtschaftlichen Flächen in Oberflächengewässer, aber auch in das Grundwasser überführt, was ein Risiko für die menschliche Gesundheit bedeutet (*Weiß 2008; Hannappel und Karfousehr 2017*).
- Für einige Wirkstoffe, die im Boden oder im Wasser nicht mehr nachweisbar sind, besteht der Verdacht, dass sie nicht vollständig abgebaut, sondern in (unbekannte) Metaboliten und Transformationsprodukte umgewandelt werden. Diese können u.U. in ihrer (toxikologischen) Wirkung ebenso kritisch sein.
- Es ist bis heute nicht bekannt oder näher untersucht, welche Pharmaka und Mengen in die Umwelt gelangen, bevor eindeutige Wirkungen auf Zielorganismen festgestellt werden können. Daher sind weitere angepasste, umfangreiche Untersuchungen und daraus resultierende Festlegungen zu Grenzwerten für die verschiedenen Umweltmilieus zukünftig von größerer Bedeutung.
- In mehreren thematischen Bereichen ist weitere Forschung erforderlich, um die Auswirkungen von Pharmaka auf die Umwelt und folglich auf die Gesundheit von Mensch und Tier beurteilen zu können (*Koopmann und Kühne 2017; Parezanović et al. 2019*). Daher sollten Mechanismen eingerichtet werden, um die Mengen und Pfade der Wirkstoffe, die in der Tierhaltung verwendet werden, zu verfolgen, um Korrelationen herzustellen und praktikable Lösungen zu finden.
- Weitere Forschungsarbeiten zu Abbau- und Metabolisierungsprozessen der Substanzen in den unterschiedlichen Umweltkompartimenten sind im Rahmen praxis- und kostenrelevanter Maßnahmen sinnvoll und erforderlich (*Kümmerer et al. 2017*).
- Veterinärpharmaka lassen sich hinsichtlich ihrer Anwendung in einerseits gut bis sehr gut abbaubare und andererseits schwerer abbaubare Substanzen bzw. Wirkstoffgruppen unterteilen.
- Die in der landwirtschaftlichen Tierhaltung eingesetzten Wirkstoffe können von (Kultur-)Pflanzen aufgenommen und angereichert werden (*Fu et al. 2017; Klement et al. 2020*).
- Der Zwischenfruchtanbau (oder ggf. Begleitfruchtanbau z.B. bei Mais) unter Berücksichtigung stark wurzelbildender, Humus- und Nährstoff- aufbauender Kulturen, insbesondere Leguminosen und NawaRo, sollte weiter verstärkt und in die Fruchtfolgen integriert werden (Abb. 28).
- Die Eliminierung bzw. Reduktion pharmazeutischer Wirkstoffe durch (Boden-)Pilze ist ein wesentliches Prinzip der Selbstreinigungskräfte in natürlichen Umweltkompartimenten wie auch analoge Untersuchungen bestätigten (*Asif et al. 2017*).
- Aerobe Abbaubedingungen bzw. -prozesse wirken sich fördernd auf die Eliminierung von Veterinärpharmaka in Böden und Wirtschaftsdünger aus. Die Strohvermistung bzw. der Festmist sind agrotechnisch sinnvolle und machbare Optionen im Rahmen einer aktuell verschärften Düngemittelverordnung.
- Die Güllevergärung vor Ausbringung führt zur Stabilisierung der Substratmatrix, der Nährstoffe und einer weitreichenden Hygienisierung und ist daher seitens der Agrarbetriebe anzustreben.
- Die direkte Ausbringung (vergorener) Wirtschaftsdünger oder als Festmist (ggf. nach Zwischenlagerung), eingearbeitet in die obere Bodenschicht, insbesondere auch direkt nach der Ernte („Stoppelacker“ ohne wachsende Kultur), ist aus Sicht der mikrobiellen Umsetzungen und Metabolisierungsprozesse von Veterinärpharmaka sinnvoll und umzusetzen.

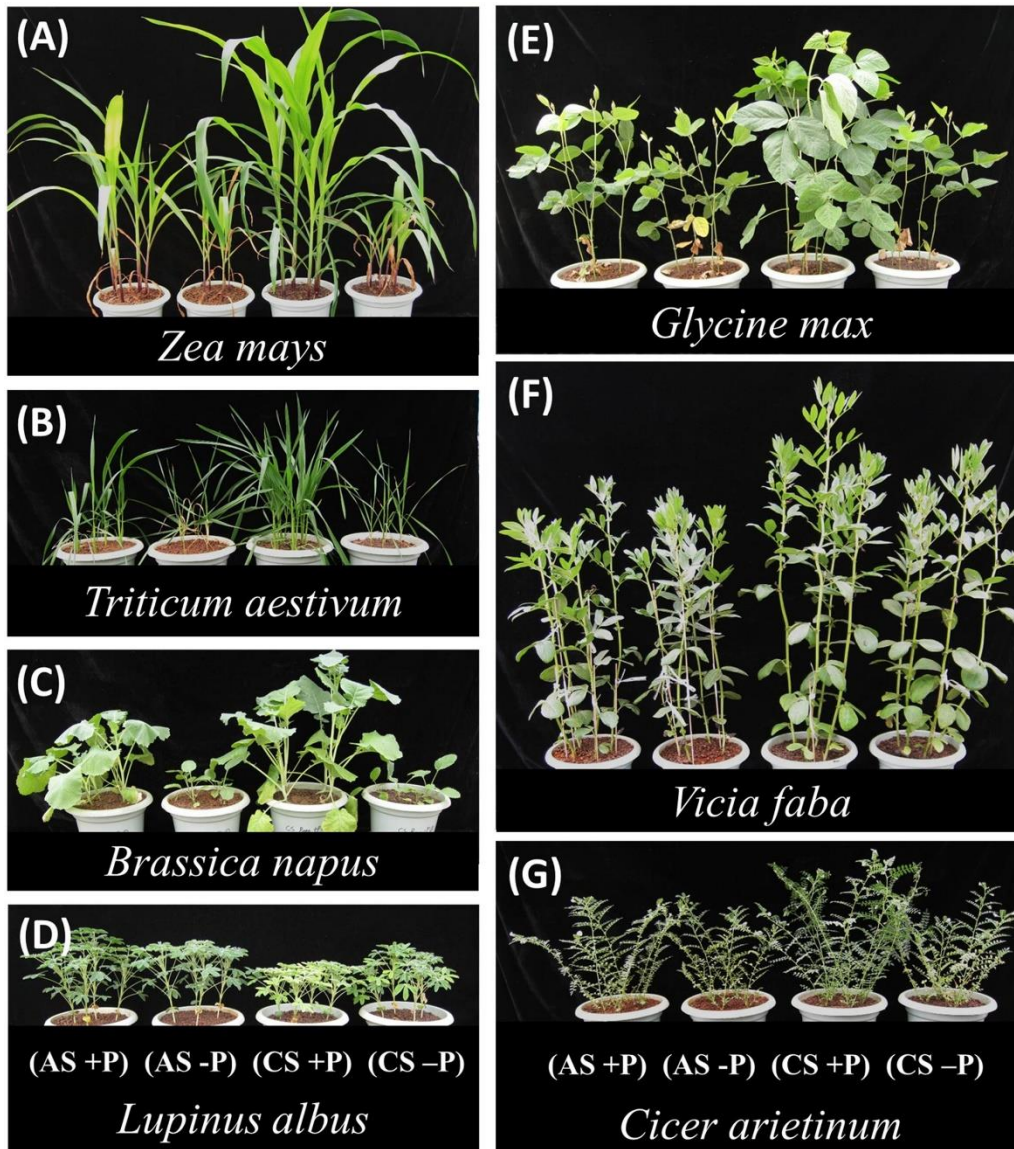


Abbildung 28: Schösslingswachstum von sieben Energie- und Zwischenfruchtpflanzenspezies nach 40 Tagen (kurz vor der Ernte); A – Mais, B – Weizen, C – Raps, D – Weiße Lupine, E – Sojabohne, F – Ackerbohne, G – Kichererbse; Behandlung für jede Spezies (v.l.n.r.) AS+P – saurer Boden mit Phosphorzugabe (100 mg P kg^{-1} Boden), saurer Boden ohne Phosphorzugabe, CS+P – kalkhaltiger Boden mit Phosphorzugabe (100 mg P kg^{-1} Boden), CS-P – kalkhaltiger Boden ohne Phosphorzugabe (Lyu et al. 2016)

Die zahlreichen Ergebnisse und Erkenntnisse aus AMEDITEC stimmen optimistisch. Der aerobe Abbau bzw. die Elimination relevanter Veterinärwirkstoffe sind verfahrenstechnisch machbar und umsetzbar, wobei einzelne Substanzen gut bis sehr gut (z.B. Albendazol, Antipyrin, Diclofenac, Fenbendazol, Prednisolon) andere wiederum schwerer abbaubar (z.B. Cypermethrin, Ivermectin, Xylazin) sind. Dies dürfte für die veterinärmedizinische Praxis interessant sein. Die Auswahl der Wirkstoffe sollte künftig auch das Kriterium ihrer Abbaubarkeit berücksichtigen. Der aerobe Abbau von Pharmaka durch Pilze wurde bereits näher untersucht (Castellet Rovira et al. 2018). Technologische Ansätze wie Strohvermischung (z.B. Tretmist), Rotteprozesse und Kompostierung sowie aerobe Gärrestbehandlung (Vererdung und Bodenbehandlung) sind klar erkennbar; ihre Weiterentwicklung und Optimierung zur praxisnahen Erprobung und Anwendung, auch unter dem Aspekt der Wirtschaftlichkeit stehen ggf. noch aus.

Biotische Wechselwirkungen mit der jeweils autochthonen Flora, neben Bakterien insbesondere auch Pilze vor allem bei der Strohvermistung und Bodenbehandlung, können Möglichkeiten der Wirksamkeit solcher Verfahrensansätze aufzeigen (*Viji und Neelanarayanan 2015*).

Bei der Düngung und Einarbeitung von (Flüssig)Wirtschaftsdünger in den Boden sollten Anteile von Stroh eine größere Rolle spielen, da dadurch die pilzliche Flora insgesamt und sog. Antagonisten wie *Trichoderma spec.* gefördert werden können. Wesentliche Mechanismen der Bodengenesung konnten bereits aufgezeigt werden (*Zhao et al. 2016; Szpyrka et al. 2020*). Durch vertiefte und genauere Kenntnisse zu den wachstumsrelevanten Wirkungen wichtiger Gruppen von Mikroorganismen wird eine Auswahl von Indikatoren für eine Bewertung möglich.

Untersuchungen mittels kultureller und molekularbiologischer Verfahren können Veränderungen des Bakterienspektrums aufzeigen. Zusammen mit den Nachweisen spezifischer Gensequenzen stellt dies eine erweiterte Betrachtung des potentiellen Risikos für den Eintrag von Wirkstoffen durch Gülle, Stallmist und Gärprodukte in die Umwelt, insbesondere den Boden dar. Hier sieht das Umweltbundesamt Handlungsoptionen und -schwerpunkte (*Kemper et al. 2018; Thiele-Bruhn 2019*). Die Prüfung von Enterobacteriaceae und Enterokokken als Indikatoren kann die Entwicklung der mikrobiellen Flora bei erhöhtem Einsatz direkter Flüssigdünger anzeigen. Daneben und somit ergänzend kann die davon verschiedene Entwicklung von Clostridien als Anaerobier verfolgt werden. Mit Passage der anaeroben Vergärung gehen derartige Indikationen aber offensichtlich verloren. Weiterhin spielen in den Untersuchungen die Auswirkungen der Pilzflora auf die Metabolisierung der Veterinärpharmaka eine größere Rolle. Deren nähere Charakterisierung sollte ein Baustein zukünftiger Forschungen sein. Die Auswahl „sicherer“ Indikatoren als Basis für eine praktikable Prüfroutine zur Hygienisierung sollte in allen Prozessstufen Bestätigung finden (*Pospiech et al. 2014*).

Die Miststapelung (Festmist ohne weiteres Umsetzen) bzw. direkter Tretmist stellen reale verfahrenstechnische Optionen dar, die bei Kosten nahe Null arbeiten. Bei Überlegungen zu Optimierungen bei der Ausbringung der Wirtschaftsdünger, inkl. Fahrgassenoptimierung, sollte der Festmist wieder stärker in den Fokus gerückt werden. Dieses Faktum gibt eine entscheidende, forschungsseitig interessante, aber insbesondere auch wirtschaftliche Orientierung und Ausrichtung vor.

Die etablierte analytische Screeningmethode in den sehr unterschiedlichen und komplexen Matrices sollte zukünftig hinsichtlich der Metaboliten bzw. Transformationsprodukte mittels HPLC-MS weiterentwickelt werden. Ein wichtiger Schritt zu einer umfänglichen Methodenentwicklung in AMEDITEC ist als Basis für fortführende Entwicklungen umgesetzt.

Die Untersuchungen eines heterogenen und breiten Spektrums von Substanz- bzw. Wirkstoffklassen hat gezeigt, welche Schwierigkeiten in der Vereinbarkeit von Vielseitigkeit und Selektivität besteht. Die strukturelle Vielfalt stellt neben dem Einfluss der Matrix aus methodischem Blickwinkel eine wesentliche Herausforderung für die Weiterentwicklung des analytischen Verfahrens dar. Durch die verschiedenartigen stofflichen Eigenschaften ergeben sich stets neue Problemstellungen, welche der kontinuierlichen Anpassung der Analytik bedürfen.

Die vorliegende Messmethode stellt aus diesem Grund auch den Ansatz für die Erweiterung auf Metaboliten und Transformationsprodukte dar. Im Hinblick auf die Nachvollziehbarkeit von Ab- und Umbauprozessen stellen Untersuchungen dieser Intermediate die logische Erweiterung und Fortsetzung für das Analyseverfahren dar. Darüber hinaus bietet die Analytik zum Einfluss der Matrix einen weiteren wesentlichen Ansatzpunkt zur Methodenmodifikation.

Wie gezeigt werden konnte, entstehen trotz der Verminderung von Matrixeffekten durch eine angepasste Probenaufarbeitung komplexe und schwer vorhersagbare Auswirkungen auf den Analyseprozess. Bei der Umsetzung von Strategien zur Reduktion der Wirkstoffe darf die Verminderung von Matrixeinflüssen nicht außer Acht gelassen werden. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit resultiert somit ein großes Potential für die Weiterentwicklung der Methodik und Aufklärung von verfahrenstechnischen Ansätzen zur Reduktion der TAM in Umweltkompartimenten.

Vor Beginn der SARS-CoV-2-Pandemie konnten im Rahmen von AMEDITEC drei größere interne Projekt-Workshops in Zusammenarbeit mit dem TLLLR durchgeführt werden. Die weitere Bearbeitung musste im Wesentlichen durch bilaterale Gespräche und Austausch der Projektpartner erfolgen.

Die sehr positive, immer vertrauliche und kooperative Zusammenarbeit und der unter dem Einfluss der SARS-CoV-2-Pandemie zwar eingeschränkte, aber dennoch fruchtbare Erfahrungsaustausch mit der TLLLR (insbesondere Labor- und Innovationsdienstleister) 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.

Literaturverzeichnis

- Anonymus (2013): Joint Statement of EFSA and EMA on the presence of residues of phenylbutazone in horse meat. In: *EFSA Journal* 11 (4), S. 3190. DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3190.
- Aprea, Cristina; Stridori, Andrea; Sciarra, Gianfranco (1997): Analytical method for the determination of urinary 3-phenoxybenzoic acid in subjects occupationally exposed to pyrethroid insecticides. In: *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 695 (2), S. 227–236. DOI: 10.1016/s0378-4347(97)00190-4.
- Asif, Muhammad B.; Hai, Faisal I.; Singh, Lakhveer; Price, William E.; Nghiem, Long D. (2017): Degradation of Pharmaceuticals and Personal Care Products by White-Rot Fungi—a Critical Review. In: *Curr Pollution Rep* 3 (2), S. 88–103. DOI: 10.1007/s40726-017-0049-5.
- Barra Caracciolo, Anna; Topp, Edward; Grenni, Paola (2015): Pharmaceuticals in the environment: biodegradation and effects on natural microbial communities. A review. In: *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 106, S. 25–36. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.11.040.
- Bassler, Rolf (1995): Die Untersuchung von Düngemitteln. 4. Aufl. Darmstadt: VDLUFA-Verl. (Methodenbuch, Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten. Hrsg. von Rolf Bassler ; Bd. 2.1).
- Bergmann, Axel; Fohrmann, Reinhard; Weber, Frank-Andreas (2011): Zusammenstellung von Monitoringdaten zu Umweltkonzentrationen von Arzneimitteln. Hg. v. Umweltbundesamt (UBA Texte, 66/2011). Online verfügbar unter <https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/461/publikationen/4188.pdf>, zuletzt geprüft am 05.11.2020.
- Braun, M.; Schmid, H.; Grundler, T.; Hülsbergen, K.-J. (2010): Root-and-shoot growth and yield of different grass–clover mixtures. In: *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 144 (2), S. 414–419. DOI: 10.1080/11263501003718604.
- Brotman, Yariv; Kapuganti, J. Gupta; Viterbo, Ada (2010): Trichoderma. In: *Current biology : CB* 20 (9), R390-1. DOI: 10.1016/j.cub.2010.02.042.
- Campbell, W. C. (1993): Ivermectin, an antiparasitic agent. In: *Medicinal research reviews* 13 (1), S. 61–79. DOI: 10.1002/med.2610130103.
- Carmine, A. A.; Brogden, R. N.; Heel, R. C.; Speight, T. M.; Avery, G. S. (1982): Tinidazole in anaerobic infections. A review of its antibacterial activity, pharmacological properties and therapeutic efficacy. In: *Drugs* 24 (2), S. 85–117. DOI: 10.2165/00003495-198224020-00001.
- Castanon, J. I. R. (2007): History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. In: *Poultry science* 86 (11), S. 2466–2471. DOI: 10.3382/ps.2007-00249.
- Castellet Rovira, Francesc; Serrà Adroguer, Montserrat; Martínez Alonso, María Ramos (2018): Fungal biodegradation of pharmaceutical active compounds in wastewater. [Barcelona]: Universitat Autònoma de Barcelona.
- Chassaing, C.; Berger, M.; Heckerroth, A.; Ilg, T.; Jaeger, M.; Kern, C. et al. (2008): Highly water-soluble prodrugs of anthelmintic benzimidazole carbamates: synthesis, pharmacodynamics, and pharmacokinetics. In: *Journal of medicinal chemistry* 51 (5), S. 1111–1114. DOI: 10.1021/jm701456r.
- Chen, Shaohua; Hu, Wei; Xiao, Ying; Deng, Yinyue; Jia, Jianwen; Hu, Meiyong (2012): Degradation of 3-phenoxybenzoic acid by a *Bacillus* sp (7).

- Costa, David; Marques, Alexandra P.; Reis, Rui L.; Lima, José L. F. C.; Fernandes, Eduarda (2006): Inhibition of human neutrophil oxidative burst by pyrazolone derivatives. In: *Free radical biology & medicine* 40 (4), S. 632–640. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.017.
- Dams, Riet; Huestis, Marilyn A.; Lambert, Willy E.; Murphy, Constance M. (2003): Matrix effect in bioanalysis of illicit drugs with LC-MS/MS. Influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. In: *J Am Soc Mass Spectrom* 14 (11), S. 1290–1294. DOI: 10.1016/S1044-0305(03)00574-9.
- Dayan, A.D (2003): Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. In: *Acta Tropica* 86 (2-3), S. 141–159. DOI: 10.1016/S0001-706X(03)00031-7.
- DIN 32645:2008-11, 2008: DIN 32645:2008-11, Chemische Analytik_ - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen_ - Begriffe, Verfahren, Auswertung.
- European Union (2002): Commission Regulation (EC) No. 1181/2002 of 1 July 2002 amending Annex I of Council Regulation (EEC) No. 2377/90: laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. In: *Official Journal of the European Communities* (L172), S. 13–20.
- Fu, Qiuguo; Ye, Qingfu; Zhang, Jianbo; Richards, Jaben; Borchardt, Dan; Gan, Jay (2017): Diclofenac in Arabidopsis cells: Rapid formation of conjugates. In: *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* 222, S. 383–392. DOI: 10.1016/j.envpol.2016.12.022.
- Green, Rhys E.; Donázar, José A.; Sánchez-Zapata, José A.; Margalida, Antoni (2016): Potential threat to Eurasian griffon vultures in Spain from veterinary use of the drug diclofenac. In: *J Appl Ecol* 53 (4), S. 993–1003. DOI: 10.1111/1365-2664.12663.
- Gross, Jürgen H. (2013): Massenspektrometrie. Ein Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-8274-2981-0>.
- Guebitz, Georg M.; Bauer, Alexander; Bochmann, Guenther; Gronauer, Andreas; Weiss, Stefan (2015): Biogas Science and Technology. Cham: Springer International Publishing (151).
- Hamscher, Gerd (2008): Review: Tierarzneimittel in der Umwelt unter besonderer Berücksichtigung von Stallstäuben. In: *J. Verbr. Lebensm.* 3 (2), S. 165–173. DOI: 10.1007/s00003-008-0342-8.
- Hamscher, Gerd; Mohring, Siegrun A. I. (2012): Tierarzneimittel in Böden und in der aquatischen Umwelt. In: *Chemie Ingenieur Technik* 84 (7), S. 1052–1061. DOI: 10.1002/cite.201100255.
- Hannappel, Stephan; Balzer, Frederike; Groeneweg, Jost; Zühlke, Sebastian; Schulz, Dietrich (2014a): Vorkommen von Tierarzneimitteln im oberflächennahen Grundwasser unter Standorten mit hoher Viehbesatzdichte in Deutschland. Incidence of veterinary drugs in near-surface groundwater below sites with high livestock density in Germany. 58. Jahrgang. Hg. v. HyWa - Hydrologie und Wasserbewirtschaftung (Hydrologie und Wasserbewirtschaftung, Heft 4). Online verfügbar unter http://www.hydor.de/downloads/PDF/veroeffentlichungen2015/Hannappel_et_al_2014_TAM.pdf, zuletzt geprüft am 18.01.2021.
- Hannappel, Stephan; Groeneweg, Jost; Zühlke, Sebastian (2014b): Antibiotika und Antiparasitika im Grundwasser unter Standorten mit hoher Viehbesatzdichte. Hg. v. Umweltbundesamt (UBA Texte, 27/2014). Online verfügbar unter https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/377/publikationen/texte_27_2014_antibiotika_und_antiparasitika_im_grundwasser_unter_standorten_mit_hoher_viehbesatzdichte_finale.pdf, zuletzt geprüft am 06.11.2020.
- Hannappel, Stephan; Karfusehr, Christel (2017): Funde von Tierarzneimitteln im Grundwasser an sechs Standorten in Niedersachsen. 10. Aufl. Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser

und Abfall (Korrespondenz Wasserwirtschaft, 8). Online verfügbar unter http://www.hydor.de/downloads/PDF/Hannappel_Karfusehr%202017.pdf, zuletzt geprüft am 18.01.2021.

Horlacher, Dieter; Rutzmoser, Karl; Schultheiß, Ute (2014): Festmist- und Jaucheanfall. Mengen und Nährstoffgehalte aus Bilanzierungsmodellen. Darmstadt: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft (KTBL-Schrift, 502).

Huang, Yichen; Xiao, Lijuan; Li, Feiyu; Xiao, Mengshi; Lin, Derong; Long, Xiaomei; Wu, Zhijun (2018): Microbial Degradation of Pesticide Residues and an Emphasis on the Degradation of Cypermethrin and 3-phenoxy Benzoic Acid: A Review. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 23 (9). DOI: 10.3390/molecules23092313.

Huczynski, Adam; Stefańska, Joanna; Przybylski, Piotr; Brzezinski, Bogumil; Bartl, Franz (2008): Synthesis and antimicrobial properties of monensin A esters. In: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 18 (8), S. 2585–2589. DOI: 10.1016/j.bmcl.2008.03.038.

Jewell, Kevin S.; Falås, Per; Wick, Arne; Joss, Adriano; Ternes, Thomas A. (2016): Transformation of diclofenac in hybrid biofilm-activated sludge processes. In: *Water research* 105, S. 559–567. DOI: 10.1016/j.watres.2016.08.002.

Kaczala, Fabio; Blum, Shlomo E. (2016): The Occurrence of Veterinary Pharmaceuticals in the Environment: A Review. In: *Current analytical chemistry* 12 (3), S. 169–182. DOI: 10.2174/1573411012666151009193108.

Kashyap, Prem Lal; Rai, Pallavi; Srivastava, Alok Kumar; Kumar, Sudheer (2017): Trichoderma for climate resilient agriculture. In: *World journal of microbiology & biotechnology* 33 (8), S. 155. DOI: 10.1007/s11274-017-2319-1.

Kaufmann, Anton; Butcher, Patrick; Maden, Kathryn; Widmer, Mirjam (2008): Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2-microm particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. In: *Journal of chromatography. A* 1194 (1), S. 66–79. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.03.089.

Kemper, Melanie; Lukat, Evelyn; Vidaurre, Rodrigo; Steinhoff-Wagner, Julia; Ilg, Yvonne; Petersen, Brigitte et al. (2018): Kommunikationsstrategien zur Verminderung von Tierarzneimittelinträgen aus der Landwirtschaft in die Umwelt. Hg. v. Umweltbundesamt (UBA Texte, 115/2018). Online verfügbar unter https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/1410/publikationen/2018-12-19_texte_115-2018_tam-kommunikation-abschlussbericht.pdf, zuletzt geprüft am 06.11.2020.

Klement, Aleš; Kodešová, Radka; Golovko, Oksana; Fér, Miroslav; Nikodem, Antonín; Kočárek, Martin; Grabic, Roman (2020): Uptake, translocation and transformation of three pharmaceuticals in green pea plants. In: *Journal of Hydrology and Hydromechanics* 68 (1), S. 1–11. DOI: 10.2478/johh-2020-0001.

Köberl, Martina; Schmidt, Ruth; Ramadan, Elshahat M.; Bauer, Rudolf; Berg, Gabriele (2013): The microbiome of medicinal plants: diversity and importance for plant growth, quality and health. In: *Frontiers in microbiology* 4, S. 400. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00400.

Kondrat, R. W.; McClusky, G. A.; Cooks, R. G. (2002): Multiple reaction monitoring in mass spectrometry/mass spectrometry for direct analysis of complex mixtures. In: *Anal. Chem.* 50 (14), S. 2017–2021. DOI: 10.1021/ac50036a020.

Koopmann, Regine; Kühne, Stefan (2017): Tierarzneimittel (Antiparasitika) im Kuhfladen. Ein Risiko für Nicht-Ziel-Organismen. (Literaturübersicht). In: *Landbauforschung/Applied agricultural and forestry research* 2S (67), S. 70–92. DOI: 10.3220/LBF1501500814000.

- Kumar, Akhilesh; Verma, Jay Prakash (2018): Does plant-Microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review? In: *Microbiological research* 207, S. 41–52. DOI: 10.1016/j.micres.2017.11.004.
- Kümmerer, K.; Peterwitz, U.; Schlett, C.; Remmler, F. (2017): Kooperative Lösungsansätze zur nachhaltigen Verminderung der Belastung von Oberflächengewässern mit Veterinärarzneimitteln im Einzugsgebiet der Talsperre Haltern. Abschlussbericht des F&E-Vorhabens, gerichtet an das Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (MKULNV). AZ:54.05.02.02-18/2014.0002. Hg. v. GELSENWASSER AG. Gelsenkirchen. Online verfügbar unter https://www.gelsenwasser.de/fileadmin/gelsenwasser_de/content/unternehmen/projekte/kloen_projekt_abschlussbericht.pdf.
- Löscher, Wolfgang; Richter, Angelika; Potschka, Heidrun (2014): Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Łukaszewicz, Paulina; Maszkowska, Joanna; Mulkiewicz, Ewa; Kumirska, Jolanta; Stepnowski, Piotr; Caban, Magda (2017): Impact of Veterinary Pharmaceuticals on the Agricultural Environment: A Re-inspection. In: *Reviews of environmental contamination and toxicology* 243, S. 89–148. DOI: 10.1007/398_2016_16.
- Lyu, Yang; Tang, Hongliang; Li, Haigang; Zhang, Fusuo; Rengel, Zed; Whalley, William R.; Shen, Jianbo (2016): Major Crop Species Show Differential Balance between Root Morphological and Physiological Responses to Variable Phosphorus Supply. In: *Frontiers in plant science* 7, S. 1939. DOI: 10.3389/fpls.2016.01939.
- Majeed, Abdul; Muhammad, Zahir; Ahmad, Habib (2018): Plant growth promoting bacteria: role in soil improvement, abiotic and biotic stress management of crops. In: *Plant cell reports* 37 (12), S. 1599–1609. DOI: 10.1007/s00299-018-2341-2.
- Martínez, José Luis (2017): Effect of antibiotics on bacterial populations: a multi-hierarchical selection process. In: *F1000Research* 6, S. 51. DOI: 10.12688/f1000research.9685.1.
- Meyer, Veronika R. (2008): Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Flüssigchromatographie. Hoboken: WILEY-VCH. Online verfügbar unter <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=259412>.
- Naumann, Klaus; Haug, G.; Hoffmann, H. (1990): Synthetic Pyrethroid Insecticides: Chemistry and Patents. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (5).
- Nicolaou, Kyriacos C.; Sorensen, Erik J. (1996): Classics in total synthesis. Weinheim: VCH. Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/description/wiley031/95051360.html>.
- Nolan, J.; Roulston, W. J.; Schnitzerling, H. J. (1979): The potential of some synthetic pyrethroids for control of the cattle tick (*Boophilus microplus*). In: *Australian veterinary journal* 55 (10), S. 463–466. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1979.tb00369.x.
- Oaks, J. Lindsay; Gilbert, Martin; Virani, Munir Z.; Watson, Richard T.; Meteyer, Carol U.; Rideout, Bruce A. et al. (2004): Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. In: *Nature* 427 (6975), S. 630–633. DOI: 10.1038/nature02317.
- Parezanović, Gordana Švonja; Lalic-Popovic, Mladena; Golocorbin-Kon, Svetlana; Vasovic, Velibor; Milijašević, Boris; Al-Salami, Hani; Mikov, Momir (2019): Environmental Transformation of Pharmaceutical Formulations: A Scientific Review. In: *Archives of environmental contamination and toxicology* 77 (2), S. 155–161. DOI: 10.1007/s00244-019-00630-z.

- Park, Jin-A; Zhang, Dan; Kim, Seong-Kwan; Cho, Sang-Hyun; Cho, Soo-Min; Yi, Hee et al. (2015): Simultaneous determination of aminopyrine and antipyrine in porcine muscle, milk, and eggs using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. In: *Journal of separation science* 38 (23), S. 4048–4054. DOI: 10.1002/jssc.201500920.
- Pospiech, Jana; Ullrich, Marc; Göttling, Sandra; Truyen, Uwe; Speck, Stephanie (2014): Hygienisierung von Wirtschaftsdünger und Gärresten. Möglichkeiten zur Hygienisierung von Wirtschaftsdünger und Gärresten. LfULG-Schriftenreihe. Unter Mitarbeit von Claudia Brückner und Evelin Ullrich. Hg. v. Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie (LfULG). Institut für Tierhygiene und öffentliches Veterinärwesen. Dresden (Schriftenreihe des LfULG, 37). Online verfügbar unter <https://publikationen.sachsen.de/bdb/artikel/20436/documents/32280>, zuletzt geprüft am 30.06.2021.
- Primel, Ednei; Caldas, Sergiane; Escarrone, Ana (2012): Multi-residue analytical methods for the determination of pesticides and PPCPs in water by LC-MS/MS. A review. In: *Open Chemistry* 10 (3), S. 1982. DOI: 10.2478/s11532-012-0028-z.
- Qi, Guangdou; Pan, Zhifei; Yamamoto, Yuki; Andriamanohiarisoamanana, Fetra Jules; Yamashiro, Takaki; Iwasaki, Masahiro et al. (2019): The survival of pathogenic bacteria and plant growth promoting bacteria during mesophilic anaerobic digestion in full-scale biogas plants. In: *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho* 90 (2), S. 297–303. DOI: 10.1111/asj.13137.
- Rathod, Dhiraj M.; Patel, Keyur R.; Mistri, Hiren N.; Jangid, Arvind G.; Shrivastav, Pranav S.; Sanyal, Mallika (2016): Liquid chromatography--tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of albendazole and albendazole sulfoxide in human plasma for bioequivalence studies. In: *Journal of pharmaceutical analysis* 6 (4), S. 226–234. DOI: 10.1016/j.jpha.2016.02.002.
- Sahlström, Leena (2003): A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. In: *Bioresource technology* 87 (2), S. 161–166. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00168-2.
- Short, C. R.; Flory, W.; Hsieh, L. C.; Barker, S. A. (1988): The oxidative metabolism of fenbendazole: a comparative study. In: *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 11 (1), S. 50–55. DOI: 10.1111/j.1365-2885.1988.tb00120.x.
- Szpyrka, Ewa; Podbielska, Magdalena; Zwolak, Aneta; Piechowicz, Bartosz; Siebielec, Grzegorz; Słowik-Borowiec, Magdalena (2020): Influence of a Commercial Biological Fungicide containing *Trichoderma harzianum* Rifai T-22 on Dissipation Kinetics and Degradation of Five Herbicides in Two Types of Soil. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (6). DOI: 10.3390/molecules25061391.
- Tavazzi, S.; Paracchini, B.; Suurkuusk, G.; Mariani, G.; Loos, R.; Ricci, M.; Gawlik, Bernd Manfred (2014): Water Framework Directive, watch list method. Analysis of diclofenac in water : validation report, according to ISO 17025 requirements. Luxembourg: Publications Office (EUR, Scientific and technical research series, 26902).
- Thiele-Bruhn, Sören (2019): Environmental risks from mixtures of antibiotic pharmaceuticals in soils. a literature review. Texte 32/209. Unter Mitarbeit von Sabine Konradi und Ines Vogel. Hg. v. Umweltbundesamt. Trier University, Soil Science Dept., Faculty VI (UBA Texte, 32). Online verfügbar unter https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/1410/publikationen/2019-04-11_texte_32-2019_mixtures-antibiotica-soil.pdf, zuletzt geprüft am 05.11.2020.
- Viji, J.; Neelanarayanan, P. (2015): Efficacy of Lignocellulolytic Fungi on the Biodegradation of Paddy Straw. In: *International Journal of Environmental Research* (9), S. 225–232. DOI: 10.22059/ijer.2015.892.

Wang, Li; Zhong, Donglian; Chen, Guangcai; Tang, Fubin; Song, Qihua; Zhang, Jianfeng (2013): Determination of antibiotic residues in manure by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid phase extraction. In: *Se pu = Chinese journal of chromatography* 31 (10), S. 1010–1015. DOI: 10.3724/SP.J.1123.2013.03048.

Weiß, Klaus (2008): Austrag von Tierarzneimitteln aus Wirtschaftsdünger in Sickerwasser, Grundwasser und oberirdische Gewässer. Abschlussbericht. Hg. v. Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU). LfU, Abt. 7., Dr. Klaus Weiß. Online verfügbar unter [https://www.bestellen.bayern.de/application/eshop_app000002?SID=866332940&ACTIONxSESSxSHOWPIC\(BILDxKEY:%27lfu_all_00107%27,BILDxCLASS:%27Artikel%27,BILDxTYPE:%27PDF%27\)](https://www.bestellen.bayern.de/application/eshop_app000002?SID=866332940&ACTIONxSESSxSHOWPIC(BILDxKEY:%27lfu_all_00107%27,BILDxCLASS:%27Artikel%27,BILDxTYPE:%27PDF%27)), zuletzt geprüft am 18.01.2021.

Xu, Q. Alan; Madden, Timothy L. (Hg.) (2012): LC-MS in Drug Bioanalysis. Boston, MA: Springer. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10583357>.

You, Youwen; Uboh, Cornelius E.; Soma, Lawrence R.; Guan, Fuyu; Li, Xiaoqing; Rudy, Jeffrey A.; Chen, Jinwen (2009): Screening, quantification, and confirmation of phenylbutazone and oxyphenbutazone in equine plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In: *Journal of analytical toxicology* 33 (1), S. 41–50. DOI: 10.1093/jat/33.1.41.

Zhao, Xiu-lan; Li, Bi-qiong; Ni, Jiu-pai; Xie, De-ti (2016): Effect of four crop straws on transformation of organic matter during sewage sludge composting. In: *Journal of Integrative Agriculture* 15 (1), S. 232–240. DOI: 10.1016/S2095-3119(14)60954-0.

Danksagung

Das Team von AMEDITEC 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, herzlich Dank sagen. In besonderer Weise gilt dies Frau Beetz und ihren MitarbeiterInnen, die stets freundlich, geduldig und hilfsbereit den Projektverlauf begleiteten und unterstützten.

Ein besonderer Dank gilt dem Thüringer Landesamt für Landwirtschaft und Ländlichen Raum (TLLLR), 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 den im Projekt integrierten Agrarbetrieben Agrargenossenschaft Diedorf/Eichsfeld e.G. und MPG Milchproduktion Am Stadtberg GmbH & Co. Biogas KG und ihren Betriebsleitern und KollegInnen für die immer sehr freundliche, offene und zuverlässige Mitarbeit und Unterstützung bedanken.

Anhang

Abbautests in Kleinstgefäßversuchen

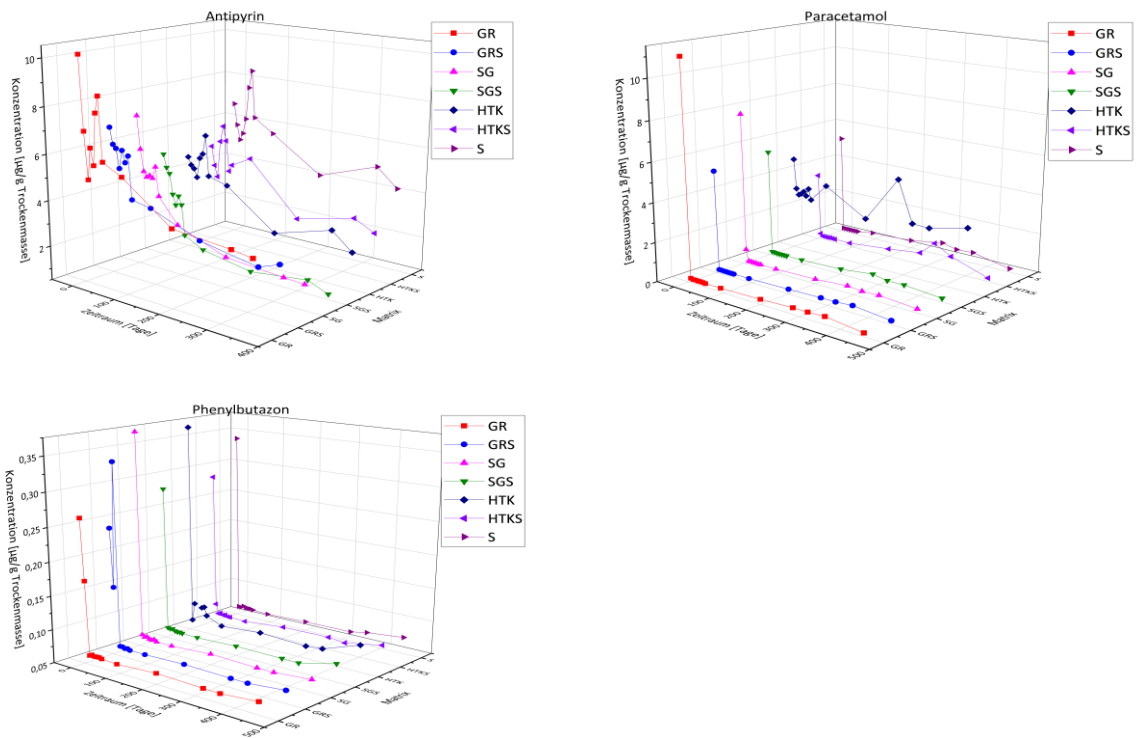


Abbildung 29: Darstellung der Abbautests in Kleinstgefäßversuchen; Antipyrin, Paracetamol, Phenylbutazon; (GR-Gärrest, GRS-Gärrest+Stroh, SG-Schweinegülle, SGS-Schweinegülle+Stroh, HTK-Hühnerkot, HTKS-Hühnerkot+Stroh, S-Stroh)

Labortechnische Abbaubersuche – Flaschenversuche

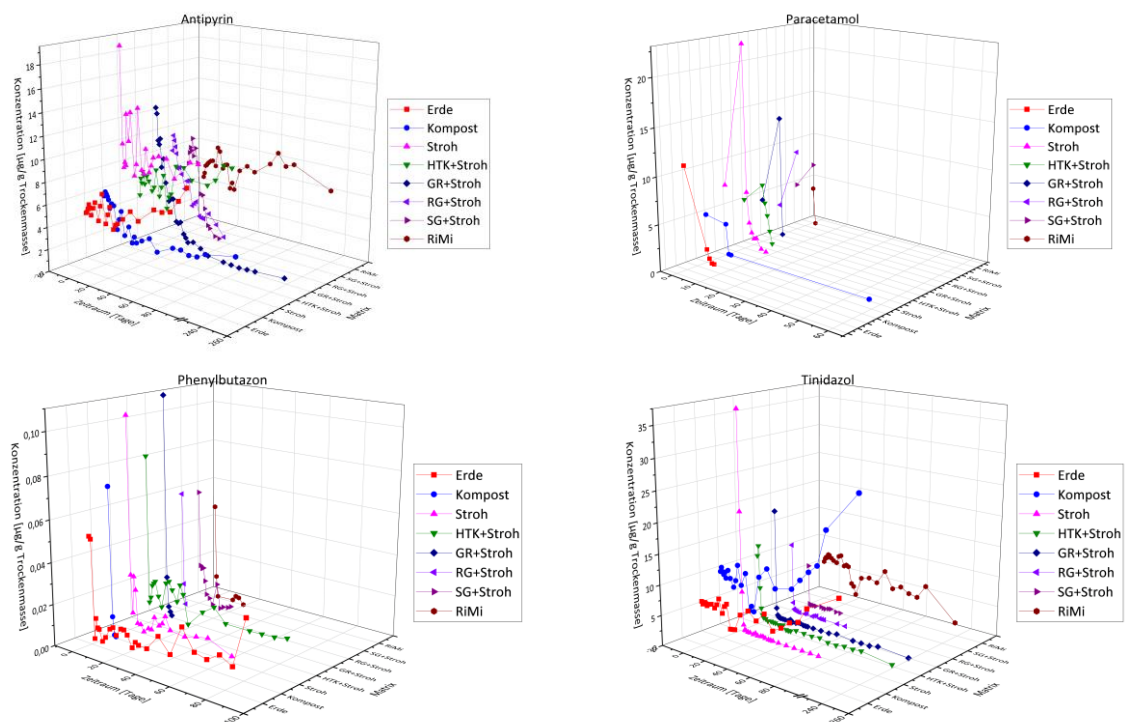


Abbildung 30: Darstellung der Abbautests in Flaschenversuchen; Antipyrin, Paracetamol, Phenylbutazon, Tinidazol (HTK-Hühnerkot, GR-Gärrest, RG-Rindergülle, SG-Schweinegülle, RiMi-Rindermist)

Feldversuche

Standort AGD

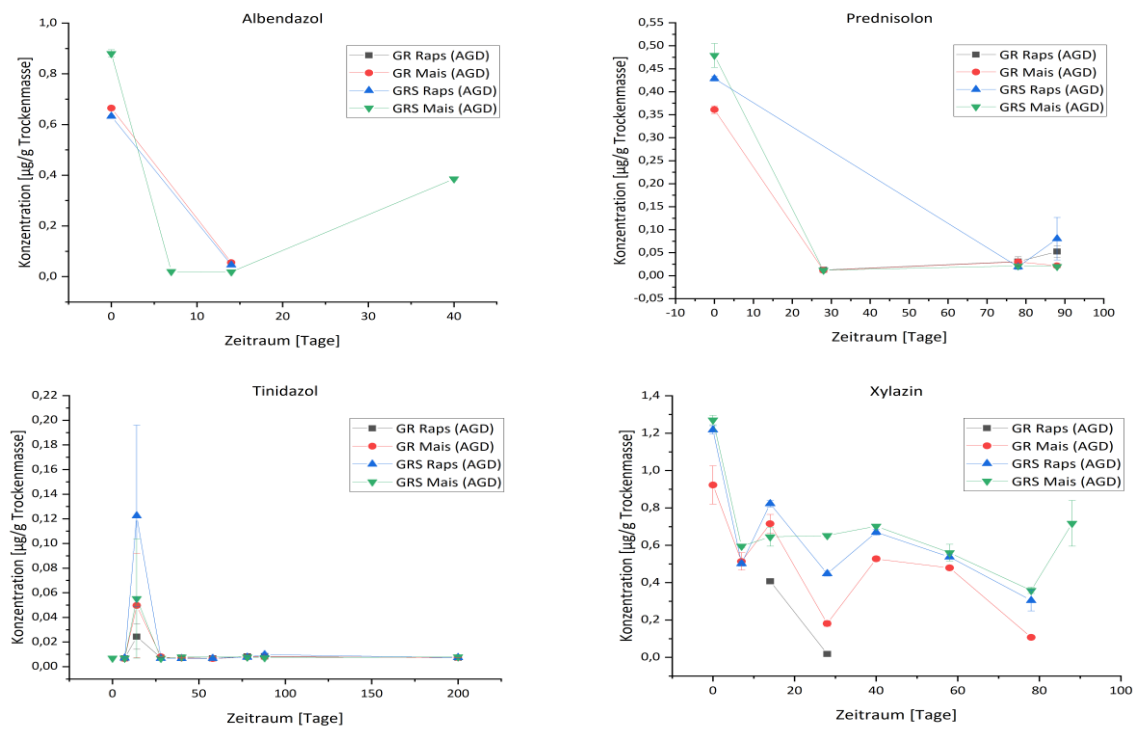


Abbildung 31: Darstellung des Abbauverhaltens auf Versuchspartzellen (Diedorf); Albendazol, Prednisolon, Tinidazol, Xylazin; GR-Gärrest, GRS-Gärrest+Stroh

Standort WH

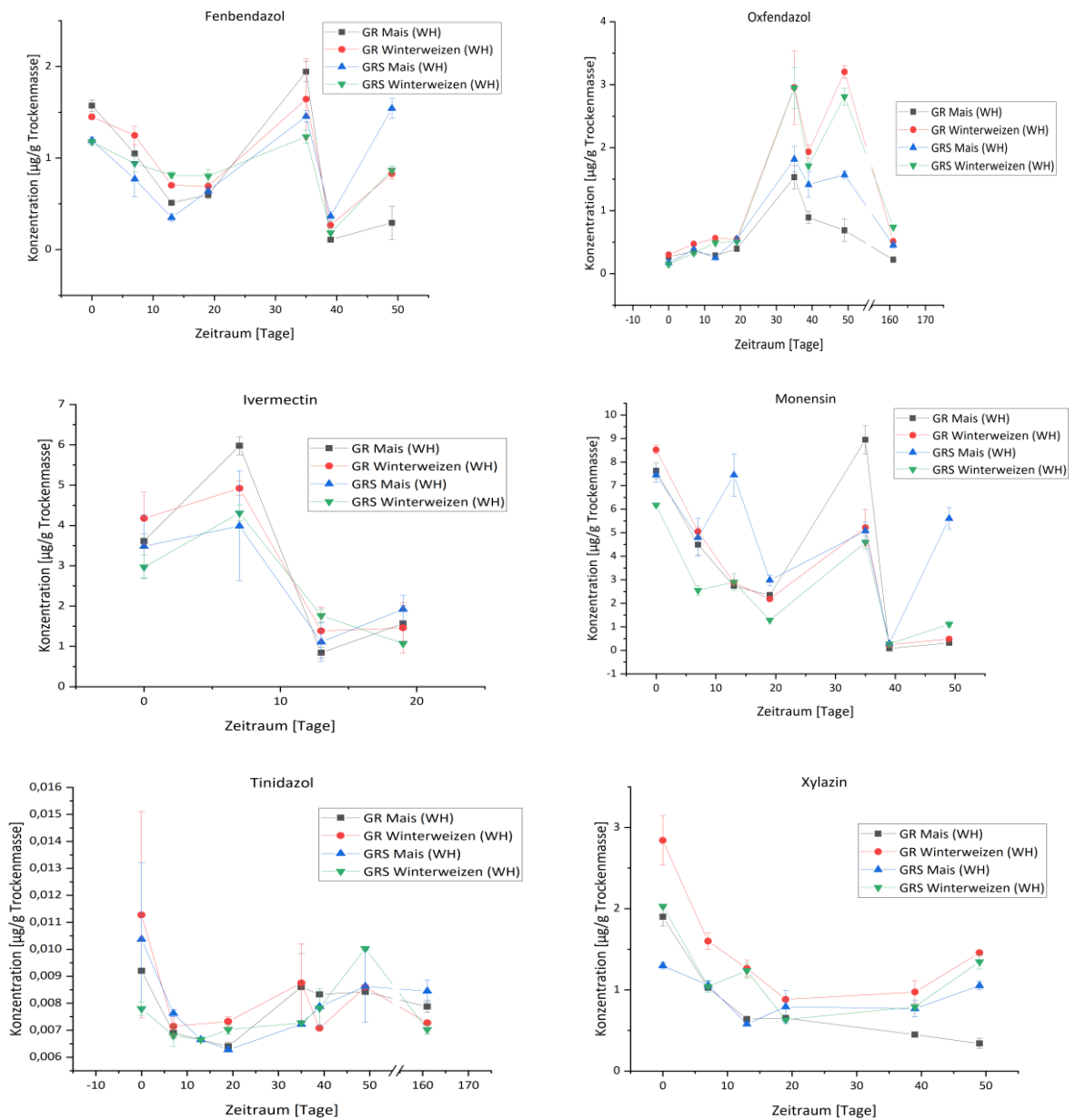


Abbildung 32: Darstellung des Abbauverhaltens auf Versuchspartzen (Westhausen); Fenbendazol, Oxfendazol, Ivermectin, Monensin, Tinidazol, Xylazin; GR-Gärrest, GRS-Gärrest+Stroh