

**Entwicklung, Optimierung und Validierung von Analyse-
methoden zur Bestimmung von Antibiotikarückständen in
wässrigen und pflanzlichen Matrices mittels UHPLC-MS/MS**

**Development, optimization and validation of analytical methods
for the determination of antibiotic residues in aqueous and plant
matrices by UHPLC-MS/MS**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fachbereich 08 - Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

durchgeführt im

Landesbetrieb Hessisches Landeslabor
Abteilung IV - Landwirtschaft und Umwelt
Fachgebiet IV.2 - Organische Kontaminanten und Umweltanalytik

vorgelegt von

Lebensmittelchemikerin

Anika Portz

geboren am 7.5.1988 in Gießen

Juli 2018

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ort, Datum

Anika Portz

Erstgutachter: Prof. Dr. Gerd Hamscher

Zweitgutachter: PD Dr. Thorsten Stahl

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hubertus Brunn, der mir ermöglichte meine Dissertation zu diesem spannenden und aktuellen Forschungsthema im Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (LHL) anfertigen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Gerd Hamscher danke ich vielmals für die Übernahme des Erstgutachtens, die wissenschaftliche Betreuung, die fachlichen Gespräche und die konstruktive Kritik.

Ein herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. Thorsten Stahl für die Betreuung vor Ort im LHL, das Korrekturlesen der Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Rolf-Alexander Düring danke ich für die Bereitschaft zur Mitwirkung in der Prüfungskommission.

Herrn Dr. Sebastian Georgii und Herrn Thiele danke ich für das entgegengebrachte Vertrauen, den gewährten Freiraum und für ihr Interesse an den Ergebnissen dieser Arbeit.

Herrn Dr. Georg Berthold vom Hessischen Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Geologie (HLNUG) danke ich für den wissenschaftlichen Austausch und die Bereitstellung zahlreicher Grundwasserproben für die Antibiotikaanalytik.

Besonderer Dank gebührt allen Kooperationspartnern, insbesondere dem Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen (LLH) und dem LHL Eichhof. Ohne deren Unterstützung bei den durchgeführten Aufwuchs- und Lysimeterversuchen wäre die Arbeit in dieser umfangreichen Form nicht möglich gewesen. Frau Carmen Bernhard und Herrn Dierk Koch vom LLH danke ich für die Beteiligung an der Planung und Durchführung der Aufwuchsversuche. Frau Carmen Bernhard und Frau Maria Göbel danke ich für die gute Pflege der Pflanzen während der Aufwuchsphase in der Versuchsanlage Harleshausen und deren Hilfe bei der Ernte. Herrn Walter Zerr und Herrn Daniel Zimmermann vom LHL Eichhof danke ich für die Bereitstellung und Vorbehandlung der Rindergülle, sowie für den Aufbau und die tägliche Bewässerung der Lysimeterrohre in Bad Hersfeld.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung IV.2 danke ich für die sehr gute Arbeitsatmosphäre im Labor, sowie deren grenzenlose Hilfsbereitschaft.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern, meinen Großeltern, meinem Bruder und meinem Freund für die unendliche Geduld, die stetige Unterstützung und den positiven Zuspruch bedanken. Ihr habt maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
Zusammenfassung	XII
Abstract	XIV
1 Einleitung	1
1.1 Antibiotika und deren Verwendung in der Nutztierhaltung	1
1.2 Verbrauchserhebungen	2
1.2.1 Abgabemengen von Veterinärantibiotika in Deutschland	2
1.3 Rechtliche Regelungen zu Veterinärantibiotika	4
1.3.1 Zulassungsverfahren	4
1.3.2 Rückstandshöchstmengen-Regelungen in Lebensmitteln und Grundwasser	4
1.4 Mögliche Eintragswege von Antibiotika in die Umwelt	5
1.5 Antibiotikarückstände in Rindergülle	7
1.5.1 Tierische Ausscheidungsraten von Antibiotika	7
1.5.2 Nachgewiesene Antibiotikamengen in Gülle - Stand der Literatur	8
1.5.3 Güllevorbehandlung und Verarbeitung	9
1.5.3.1 Fermentation und Lagerung	9
1.5.3.2 Verwendung in Biogasanlagen	10
1.6 Antibiotikarückstände im Boden durch Eintrag von Gülle	11
1.6.1 Verhalten von Antibiotika im Boden	11
1.6.2 Bindungsarten von Antibiotika an Bodenpartikel	14
1.7 Antibiotikarückstände in Pflanzen	15
1.7.1 Aufnahme von Antibiotika über das Wurzelsystem	15
1.7.2 Einflussfaktoren auf die Aufnahme von Schadstoffen in Pflanzen	16
1.7.3 Besonderheiten bei der Pflanzenaufnahme ionisierbarer Stoffe	19
1.8 Wirkstoffgruppe der Tetracycline	21
1.8.1 Wirkmechanismus	21
1.8.2 Physikalische und chemische Eigenschaften	21
1.8.3 Bildung von Transformationsprodukten	22
1.9 Wirkstoffgruppe der Sulfonamide	23
1.9.1 Wirkmechanismus	23
1.9.2 Physikalische und chemische Eigenschaften	23
1.9.3 Bildung von Metaboliten	24
1.10 Analytik	25
1.10.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)	25
1.10.1.1 Das Elektrospray-MS-Interface (Ionenquelle)	27
1.10.1.2 Tandem-Massenspektrometer (Massenanalysator)	28
2 Motivation und Zielsetzung	30

3	Material und Methoden	32
3.1	Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	32
3.2	Eingesetzte Zielanalyte und interne Standards	34
3.3	Ansetzen von Lösungen	36
3.3.1	Puffersysteme	36
3.3.2	Stamm- und Kalibrierlösungen	37
3.3.3	Interne Standardlösungen (ISTD)	38
3.3.4	Ansetzen von Matrixkalibrierungen	39
3.4	Vorbehandlung von Glasgeräten	39
3.5	Bestimmung der Trockenmasse	39
3.6	Aufwuchsversuche (Gefäßversuche)	40
3.6.1	Versuchsanlage	40
3.6.2	Versuchsbeschreibung zur Aufwuchsstudie 2014: Deutsches Weidelgras	40
3.6.2.1	Auswahl des Saatgutes	40
3.6.2.2	Gülleproben, Dotierungen und Vorbehandlung durch Fermentation	41
3.6.2.3	Bodenproben und Charakterisierung der verwendeten Versuchsböden	41
3.6.2.4	Versuchsdurchführung	42
3.6.2.5	Probenübersicht mit Erntemengen	44
3.6.3	Versuchsbeschreibung zur Aufwuchsstudie 2015: Möhren	45
3.6.3.1	Auswahl des Saatgutes	45
3.6.3.2	Gülleproben, Dotierungen und Vorbehandlung durch Fermentation und Lagerung	45
3.6.3.3	Charakterisierung des verwendeten Versuchsbodens	45
3.6.3.4	Versuchsdurchführung	45
3.6.3.5	Probenübersicht mit Ernteerträgen	46
3.7	Lysimeterversuche	47
3.7.1	Versuchsbeschreibung zur Lysimeterstudie im Labormaßstab	47
3.7.1.1	Gülleproben, Dotierungen und Vorbehandlung durch Fermentation	47
3.7.1.2	Charakterisierung der verwendeten Versuchsböden	47
3.7.1.3	Versuchsdurchführung	48
3.7.1.4	Probenübersichten	49
3.8	Grundwasseruntersuchungen	50
3.9	Messmethode zur Bestimmung von Antibiotika in verschiedenen Umweltmatrices mittels UHPLC-MS/MS	51
3.9.1	Chromatographische Bedingungen	51
3.9.2	Massenspektrometrische Bedingungen	52
3.9.3	Identifizierung und Quantifizierung der Analyte / Datenauswertung	54
3.10	Entwicklung und Optimierung der Probenvorbereitungsmethode für feststoffreiche Umweltproben anhand von Rindergülle	55
3.10.1	Fest-Flüssig-Extraktion	56
3.10.1.1	Wahl des geeigneten Extraktionsmittels	56
3.10.1.2	Optimierung der Extraktionsbedingungen	57
3.10.2	Festphasenextraktion	57
3.10.2.1	Auswahl der geeigneten SPE-Kartusche	57
3.10.2.2	Screening ohne Gülle-Zusatz	57
3.10.2.3	Screening mit Gülle-Zusatz	58
3.10.3	Übertragung der optimierten Probenaufarbeitungsmethode auf weitere Matrices	59
3.10.4	Optimierte Versuchsvorschriften zur Probenaufarbeitung	59
3.10.4.1	Versuchsvorschrift für Gülle, Weidelgras und Möhren	59

3.10.4.2	Versuchsvorschrift für Boden (Volkmarser Sand und Baunataler Löß)	60
3.11	Entwicklung und Optimierung der Probenvorbereitungsmethode für Wasserproben	63
3.11.1	Bestimmung von Antibiotika im Grundwasser	63
3.11.2	Bestimmung von Antibiotika in Bodeneluaten aus Lysimeterstudien	63
3.12	Validierung der entwickelten Analysemethoden	65
3.12.1	Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen	65
3.12.2	Wiederfindungen	66
3.12.3	Linearität über den Arbeitsbereich	66
3.12.4	Präzision	69
3.12.5	Messunsicherheitsabschätzung	70
3.12.6	Richtigkeit (Teilnahme an Ringversuchen)	70
3.12.7	Weitere qualitätssichernde Maßnahmen	72
4	Ergebnisse	73
4.1	Ergebnisse der Methodenentwicklung	73
4.1.1	Fest-Flüssig-Extraktion	73
4.1.2	Festphasenextraktion	77
4.1.2.1	Auswahl der SPE-Kartusche: Screening ohne Gülle-Zusatz	77
4.1.2.2	Screening mit Gülle-Zusatz	78
4.1.3	Übertragung der optimierten Probenaufarbeitungsmethode auf weitere Matrices	81
4.1.4	Bestimmung von Antibiotika in Bodeneluaten aus Lysimeterstudien	82
4.2	Verfahrenskenndaten	83
4.2.1	Verfahrenskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Gülle	83
4.2.2	Verfahrenskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Weidelgras	83
4.2.3	Verfahrenskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Möhren	84
4.2.4	Verfahrenskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Boden	86
4.2.5	Verfahrenskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Wasser	87
4.3	Aufwuchsversuche in Mitscherlichgefäßen	88
4.3.1	Untersuchung des Weidelgrasaufwuchses	88
4.3.1.1	Untersuchung der Grasproben	88
4.3.1.2	Untersuchung der Rindergülle nach durchgeführter Fermentation	92
4.3.1.3	Untersuchung der Bodenproben nach der Ernte der Pflanzen	93
4.3.1.4	Bilanzierung des Weidelgrasaufwuchses	95
4.3.2	Untersuchung des Möhrenaufwuchses	99
4.3.2.1	Untersuchung der Möhren	99
4.3.2.2	Untersuchung der Rindergülle im Verlauf der Fermentation und Lagerung	103
4.3.2.3	Einfluss der Güllevorbehandlung auf die Zusammensetzung der Gülle	106
4.3.2.4	Untersuchung der Bodenproben nach der Ernte der Möhren	106
4.3.2.5	Bilanzierung des Möhrenaufwuchses	108
4.4	Lysimeterstudien im Labormaßstab	111
4.4.1	Untersuchung der Bodeneluate	111
4.4.2	Untersuchung der Bodenschichten	114
4.4.3	Bilanzierung der Lysimeterstudie	117
4.5	Routineanalytik - Grundwassermessprogramm	119
5	Diskussion	122
5.1	Einordnung der entwickelten Methoden in den Kontext der Literatur	123
5.2	Antibiotikarückstände in Rindergülle der Aufwüchse und Lysimeter	127

5.2.1	Einfluss der Güllevorbehandlungen auf die Antibiotikakonzentration in der Gülle	127
5.3	Antibiotikarückstände in den Versuchsböden	133
5.3.1	Antibiotikarückstände in unterschiedlichen Bodentiefen der Lysimeterrohre	133
5.3.2	Antibiotikarückstände in Böden der Aufwuchsstudien nach der Ernte	135
5.4	Antibiotikagehalte in Aufwuchspflanzen	141
5.4.1	Antibiotikaübergang in Deutsches Weidelgras der Sorte „Lemmos“	142
5.4.2	Antibiotikaübergang in Möhren der Sorte „Almaro“	145
5.4.3	Betrachtung der Ergebnisse im Kontext mit der Literatur	152
5.4.4	Bildung von Abbau- und Transformationsprodukten - Pflanzenmetabolismus	154
5.4.5	Risikobewertung einer möglichen menschlichen Exposition	155
5.5	Antibiotikarückstände im Wasser	157
5.5.1	Nachweis der Antibiotika in Bodeneluatn der Lysimeterstudie	157
5.5.2	Nachweis von Antibiotikarückständen in hessischen Grundwasserproben	161
6	Fazit und Ausblick	169
7	Literaturverzeichnis	172
8	Anhang	XVI
8.1	Anhang A zu Kapitel 1 „Einleitung“	XVI
8.2	Anhang B zu Kapitel 4 „Ergebnisse“	XVIII
8.3	Anhang C zu Kapitel 5 „Diskussion	XXIX

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Antibiotika-Abgabemengen an Tierärzte	3
Abbildung 1-2:	Mögliche Eintragspfade von Antibiotika in die Umwelt.....	6
Abbildung 1-3:	Bindungsverhalten von Antibiotika im Boden und dessen Kompartimenten.....	14
Abbildung 1-4:	Transport von Mineralstoffen und Wasser in Wurzeln	16
Abbildung 1-5:	chematische Darstellung der Wechselwirkungen von Pflanzen mit der Umwelt	18
Abbildung 1-6:	Biokonzentrationsfaktoren verschiedener Pflanzenkompartimente,	18
Abbildung 1-7:	Dissoziationskurve von Sulfamethazin in Abhängigkeit des pH-Wertes	20
Abbildung 1-8:	Dissoziationsverhalten von Antibiotika in Pflanzenzellen	20
Abbildung 1-9:	Grundstruktur der Wirkstoffgruppe der Tetracycline.....	22
Abbildung 1-10:	Epimerisierung und Isomerisierung von Chlortetracyclin.....	22
Abbildung 1-11:	Grundstruktur der Wirkstoffgruppe der Sulfonamide	23
Abbildung 1-12:	<i>N</i> -Acetyl-Sulfamethazin.....	24
Abbildung 1-13:	<i>N</i> -Acetyl-Sulfamethoxazol.....	24
Abbildung 1-14:	Schematischer Aufbau eines Tandem-Massenspektrometers der Firma Waters	27
Abbildung 1-15:	Aufbau der Ionenquelle und schematische Funktionsweise der Elektrosprayionisation	28
Abbildung 1-16:	Schematische Darstellung eines Quadrupol-Massenspektrometers.....	28
Abbildung 1-17:	Schematischer Aufbau einer Kollisionszelle	29
Abbildung 3-1:	Versuchsanlage des Landesbetriebes Landwirtschaft Hessen	40
Abbildung 3-2:	Übersicht zur zeitlichen Abfolge der Versuchsdurchführung des Aufwuchses 2014.....	43
Abbildung 3-3:	Erhaltene Ernteerträge des Möhrenaufwuchses 2015	46
Abbildung 3-4:	Lysimeterrohre im Labormaßstab	47
Abbildung 3-5:	Verlagerung von Antibiotika in Bodenschichten	48
Abbildung 3-6:	Entwicklungs- und Optimierungsschritte der Fest-Flüssig-Extraktion.....	55
Abbildung 3-7:	Entwicklungs- und Optimierungsschritte der Festphasenextraktion	55
Abbildung 3-8:	Schematische Übersicht zur Probenaufarbeitung feststoffreicher Umweltproben	62
Abbildung 3-9:	Schematische Übersicht zur Probenaufarbeitung wässriger Umweltproben	64
Abbildung 3-10:	Beispielhafte Matrixkalibrierfunktion über eine Dekade zur Ermittlung der Bestimmungsgrenzen für Doxycyclin in Möhrenrüben	65
Abbildung 3-11:	Beispielhafte Matrixkalibrierfunktion zur Bestimmung von Sulfamethoxazol in Möhrenrüben	67
Abbildung 3-12:	Laborvergleichsuntersuchung 02300 des Anbieters FAPAS	72
Abbildung 4-1:	Wiederfindungen bei Verwendung verschiedener organischer Lösungsmittel	73
Abbildung 4-2:	Wiederfindungen bei Verwendung wässriger Puffersysteme unterschiedlicher pH-Werte.....	74
Abbildung 4-3:	Zerfallsprodukte des Chlortetracyclins	74
Abbildung 4-4:	Optimierung der Extraktionsbedingungen bei Verwendung von McIlvaine-Puffer pH 4	75
Abbildung 4-5:	Optimierung der Extraktionsbedingungen bei Verwendung von McIlvaine-Puffer pH 7	75
Abbildung 4-6:	Optimierung der Extraktionsbedingungen bei Verwendung von McIlvaine-Puffer pH 10	76
Abbildung 4-7:	SPE-Kartuschenauswahl: Wiederfindungen der Tetracycline.....	77
Abbildung 4-8:	SPE-Kartuschenauswahl: Wiederfindungen der Sulfonamide	77
Abbildung 4-9:	Wiederfindungen der Tetracycline in Rindergülle nach Aufreinigung und Anreicherung der Extrakte über Strata-X 60 mg Kartuschen im Vergleich zu Lösungsmittelstandards der gleichen Analytkonzentration.....	78
Abbildung 4-10:	Wiederfindungen der Sulfonamide in Rindergülle nach Aufreinigung und Anreicherung der Extrakte über Strata-X 60 mg Kartuschen im Vergleich zu Lösungsmittelstandards der gleichen Analytkonzentration.....	78
Abbildung 4-11:	Wiederfindungen der Tetracycline und Sulfonamide in Rindergülle nach Aufreinigung und Anreicherung der Extrakte über Strata-X 60 mg Kartuschen im Vergleich zu Matrixstandards der gleichen Analytkonzentration	79
Abbildung 4-12:	Optimierte Probenvorbereitungsbedingungen für den Nachweis von Antibiotikarückständen in Gülle	80
Abbildung 4-13:	Optimierung der Extraktionsmittelzusammensetzung für den Nachweis von Antibiotika im Boden	81
Abbildung 4-14:	Weitere Optimierung der Extraktionsmittelzusammensetzung für den Nachweis von Antibiotika im Boden.....	81
Abbildung 4-15:	Gegenüberstellung der verschiedenen Probenzusätze zur Optimierung der Anreicherung von Wasserproben.....	82
Abbildung 4-16:	Darstellung der nachgewiesenen Antibiotika in den Weidelgrasproben des Ansatzes mit einem 100 mg-Zusatz an Sulfamethazin pro kg Gülle	89
Abbildung 4-17:	Darstellung der nachgewiesenen Antibiotika in den Weidelgrasproben des Ansatzes mit einem 50 mg-Zusatz an Sulfamethazin pro kg Gülle.....	90
Abbildung 4-18:	Darstellung der nachgewiesenen Antibiotika in den Weidelgrasproben des Ansatzes mit einem 20 mg-Zusatz an Sulfamethazin pro kg Gülle	91
Abbildung 4-19:	Gegenüberstellung der gefundenen Sulfamethazingehalte in Bezug auf die Frisch- und Trockenmasse...91	
Abbildung 4-20:	Antibiotikagehalte in der Rindergülle nach durchgeführter Fermentation	93
Abbildung 4-21:	Entstehung von (Epi)-iso-Chlortetracyclin aus (Epi)-Chlortetracyclin durch den Fermentationsprozess	93

Abbildung 4-22:	Darstellung der gefundenen Antibiotika in den „Volkmarser Sand“-Bodenproben	94
Abbildung 4-23:	Darstellung der gefundenen Antibiotika in den „Baunataler Löß“-Bodenproben	94
Abbildung 4-24:	Untersuchungsumfang eines Aufwuchsprojektes	95
Abbildung 4-25:	Bilanzierungsschema für Deutsches Weidelgras am Beispiel des 100 mg kg ⁻¹ -Versuchsansatzes mit Sulfamethazinzugabe über das Düngemittel	97
Abbildung 4-26:	Darstellung der gefundenen Antibiotikakonzentration in dem Möhrengrün	100
Abbildung 4-27:	Darstellung der gefundenen Antibiotikakonzentration in den Möhrenrüben	100
Abbildung 4-28:	Darstellung der gefundenen Antibiotikakonzentration in den Möhrenschaalen	101
Abbildung 4-29:	Darstellung der gefundenen Antibiotikakonzentration in den Möhrenwurzeln	102
Abbildung 4-30:	Darstellung der Konzentration der gefundenen Metabolite und Transformationsprodukte in den Möhrenwurzeln	102
Abbildung 4-31:	Eliminierungsverhalten der einzelnen Wirkstoffe in Gülle im Laufe des Fermentationsprozesses über einen Zeitraum von 40 Tagen	104
Abbildung 4-32:	Eliminierungsverhalten der einzelnen Wirkstoffe in Gülle im Laufe der Güllelagerung über einen Zeitraum von 8 Tagen	105
Abbildung 4-33:	Antibiotikagehalte in Bodenproben des Möhrenaufwuchses nach der Ernte	107
Abbildung 4-34:	Antibiotikagehalte in Bodenproben des Möhrenaufwuchses nach der Ernte	108
Abbildung 4-35:	Bilanzierung des Möhrenaufwuchses unter Angabe der prozentualen Transferraten von dem Boden in die Pflanzenkompartimente und des prozentualen Verbleibs im Versuchsboden. Gegenüberstellung der Ansätze mit gelagerter Gülle.	109
Abbildung 4-36:	Bilanzierung des Möhrenaufwuchses unter Angabe der prozentualen Transferraten von dem Boden in die Pflanzenkompartimente und des prozentualen Verbleibs im Versuchsboden. Gegenüberstellung der Ansätze mit fermentierter Gülle	110
Abbildung 4-37:	Sulfamethazingehalte in Bodeneluatn der Varianten 47, 49 und 51 mit Volkmarser Sandboden	112
Abbildung 4-38:	Sulfamethazingehalte in Bodeneluatn der Varianten 21, 23 und 25 mit Baunataler Lößboden	112
Abbildung 4-39:	Antibiotikaverlagerung in Lysimetern mit Volkmarser Sandboden	114
Abbildung 4-40:	Antibiotikaverlagerung in Lysimetern mit Baunataler Lößboden	115
Abbildung 4-41:	Ergebnisse des Screenings von Grundwasserproben im Jahr 2016.	119
Abbildung 4-42:	Ergebnisse des Screenings von Grundwasserproben im Jahr 2017.	121
Abbildung 5-1:	Umfang und Ziele der Untersuchung des Transfers von Antibiotika aus güllegedüngten Böden in Pflanzen und in das Grundwasser	122
Abbildung 5-2:	Isomerisierung des Chlortetracyclins unter alkalischen Bedingungen	130
Abbildung 5-3:	Mögliche Transportwege für Antibiotika in Böden	136
Abbildung 5-4:	Komplexbildung zwischen Tetracyclinen und Magnesiumionen	138
Abbildung 5-5:	Verteilung der Antibiotikawirkstoffe in den Möhrenkompartimenten	146
Abbildung 5-6:	Dissoziation von Sulfonamiden	147
Abbildung 5-7:	Dissoziation von Tetracyclinen	147
Abbildung 5-8:	Dissoziationskurven für die in dieser Arbeit untersuchten Sulfonamide (oben) und Tetracycline (unten)	148
Abbildung 5-9:	Lysimeterstudie: Visuelle Übersicht der Wirkstofffrachten in die Bodeneluate	160
Abbildung 5-10:	Hessenkarte und markierte Messstellen mit hohen Antibiotikabefunden	163
Abbildung 5-11:	Hydrogeologische Lage der Messstelle 1	164
Abbildung 5-12:	Hydrogeologische Lage der Messstelle 2	165
Abbildung 5-13:	Hydrogeologische Lage der Messstellen 3 bis 9	166
Abbildung 5-14:	Hydrogeologische Lage der Messstelle 10	166
Abbildung 5-15:	Hydrogeologische Lage der Messstelle 11	167

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1:	Vergleich der Antibiotika-Abgabemengen von 2011 bis 2016	2
Tabelle 1-2:	Adsorptionskoeffizienten für Tetracycline und Sulfonamide in Böden.....	13
Tabelle 1-3:	Verschiedene Vertreter aus der Wirkstoffgruppe der Tetracycline.....	22
Tabelle 1-4:	Verschiedene Vertreter aus der Wirkstoffgruppe der Sulfonamide.....	24
Tabelle 3-1:	Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	32
Tabelle 3-2:	Verwendete SPE-Kartuschen.....	34
Tabelle 3-3:	Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel.....	34
Tabelle 3-4:	Verwendete Antibiotika.....	35
Tabelle 3-5:	Verwendete Metabolite und Transformationsprodukte.....	35
Tabelle 3-6:	Verwendete Interne Standards.....	36
Tabelle 3-7:	Standards für den Nachweis von Antibiotikarückständen in Gülle, Weidelgras und Möhren.....	37
Tabelle 3-8:	Standards für den Nachweis von Antibiotikarückständen in Wasserproben.....	38
Tabelle 3-9:	Pipettierschema zum Ansetzen der internen Standardlösungen.....	38
Tabelle 3-10:	Pipettierschema zum Ansetzen der Matrixkalibrierung am Beispiel Möhrenwurzeln.....	39
Tabelle 3-11:	Kenndaten der verwendeten Böden im Gefäß- und Lysimeterversuch.....	42
Tabelle 3-12:	Variantenübersicht und Ernteerträge des Weidelgrasaufwuchses 2014.....	44
Tabelle 3-13:	Variantenübersicht und Erntemengen des Möhrenaufwuchses 2015.....	46
Tabelle 3-14:	Übersicht der Bodenschnitte und der darin enthaltenen Mengen an Boden.....	49
Tabelle 3-15:	Variantenübersicht der Lysimeterrohre.....	50
Tabelle 3-16:	Chromatographische Bedingungen.....	51
Tabelle 3-17:	Massenspektrometrische Bedingungen (beispielhaft).....	52
Tabelle 3-18:	Massenübergänge und massenspektrometrische Einstellungen.....	53
Tabelle 3-19:	Fortführung der Tabelle 3-18	53
Tabelle 3-20:	Verfahrenskenndaten der Kalibrierung am Beispiel Möhrenrüben.....	68
Tabelle 3-21:	Lineare Arbeitsbereiche für alle in der vorliegenden Arbeit analysierten Matrices.....	68
Tabelle 3-22:	Ringversuchsergebnisse zu „AZ - Arzneimittel, Industriechemikalien und Zuckerzusatzstoffe“.....	71
Tabelle 3-23:	Ringversuchsergebnisse zu „02290 - Tetracycline in Honig und 02300 - Tetracycline in Schweinemuskulatur“.....	71
Tabelle 4-1:	Mittlere Wiederfindungsraten (WDF) bei Extraktion mit verschiedenen Puffern bei verschiedenen Temperaturen.....	76
Tabelle 4-2:	Gegenüberstellung der Wiederfindungen.....	80
Tabelle 4-3:	Prüfung der Übertragbarkeit der Probenaufarbeitungsmethode für Gülle auf weitere Matrices.....	81
Tabelle 4-4:	Validierungskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Rindergülle.....	83
Tabelle 4-5:	Validierungskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Weidelgras.....	83
Tabelle 4-6:	Validierungskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Möhrenrüben.....	84
Tabelle 4-7:	Validierungskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Möhrenschnitten.....	84
Tabelle 4-8:	Validierungskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Möhrenwurzeln.....	85
Tabelle 4-9:	Validierungskenndaten für den Nachweis von Antibiotika im Möhrengrün.....	85
Tabelle 4-10:	Validierungskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Sandboden.....	86
Tabelle 4-11:	Validierungskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Lössboden.....	86
Tabelle 4-12:	Validierungskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Bodeneluat.....	87
Tabelle 4-13:	Validierungskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Grundwasser.....	87
Tabelle 4-14:	Verbleib der über Gülle eingetragenen Antibiotika im Boden nach Ernte der Pflanzen und deren Transferraten in die Weidelgras-Schnitte.....	98
Tabelle 4-15:	Ergebnisse der Nährstoffanalyse des LHL Eichhofs für die Rindergülle.....	106
Tabelle 4-16:	Antibiotika-Transferraten vom Boden in die einzelnen Möhrenkompartimente und prozentualer Verbleib im Boden für Versuchsansätze mit gelagerter Rindergülle.....	109
Tabelle 4-17:	Antibiotika-Transferraten vom Boden in die einzelnen Möhrenkompartimente und prozentualer Verbleib im Boden für Versuchsansätze mit fermentierter Rindergülle.....	110
Tabelle 4-18:	Zusammenstellung der Untersuchungsergebnisse für Bodeneluate der Versuchsansätze mit Sulfamethazinaufgabe über Rindergülle.....	113
Tabelle 4-19:	Bilanzierung der Lysimeterstudie. Prozentualer Übergang von Sulfamethazin in die Bodeneluate aus Versuchsansätzen mit Sandboden und Lössboden.....	117
Tabelle 4-20:	Bilanzierung der Lysimeterstudie. Prozentualer Verbleib der Zielanalyten in den Lysimeterböden aus den 100 mg kg ⁻¹ - Versuchsansätzen.....	118
Tabelle 4-21:	Zusammenstellung der Antibiotikagehalte in Grundwasserproben des Jahres 2016.....	120
Tabelle 4-22:	Zusammenstellung der Antibiotikagehalte in Grundwasserproben des Jahres 2017.....	121
Tabelle 5-1:	Dissoziationskonstanten ausgewählter Tetracycline und Sulfonamide.....	147
Tabelle 5-2:	Dissoziationsverhalten der Tetracycline und Sulfonamide in Abhängigkeit des umgebenden Milieus.....	148
Tabelle 5-3:	Hydrogeologische Daten der Messstellen.....	163

Tabelle A-1:	Nachgewiesene Tetracycline und Sulfonamide in Gülleproben verschiedener Monitoringstudien.	XVI
Tabelle A-2:	Fortführung der Tabelle A-1	XVII
Tabelle B-1:	Antibiotikagehalte im Deutschen Weidelgras „Lemmos“ des Aufwuchsjahres 2014, welches auf Sandboden kultiviert wurde.	XVIII
Tabelle B-2:	Antibiotikagehalte im Deutschen Weidelgras „Lemmos“ des Aufwuchsjahres 2014, welches auf Lößboden kultiviert wurde.	XIX
Tabelle B-3:	Antibiotikagehalte in Rindergülle des Aufwuchsjahres 2014 nach durchgeführter Fermentation.	XX
Tabelle B-4:	Nachgewiesene Transformationsprodukte in Rindergülle des Aufwuchsjahres 2014 nach durchgeführter Fermentation.	XX
Tabelle B-5:	Nachgewiesene Antibiotikagehalte im Boden nach der Ernte der fünf Weidelgras-Schnitte.	XXI
Tabelle B-6:	Antibiotikagehalte in Möhren der Sorte „Almaro“ des Aufwuchsjahres 2015, welche mit antibiotikahaltiger gelagerter und fermentierter Gülle gedüngt wurden.	XXII
Tabelle B-7:	Gefundene Metabolite und Transformationsprodukte in Möhren der Sorte „Almaro“ des Aufwuchsjahres 2015, welche mit gelagerter und fermentierter Gülle gedüngt wurden.	XXIII
Tabelle B-8:	Antibiotikagehalte in Rindergülle des Aufwuchsjahres 2015 während des Fermentationsprozesses.	XXIV
Tabelle B-9:	Fortführung der Tabelle B-8	XXV
Tabelle B-10:	Antibiotikagehalte in Rindergülle des Aufwuchsjahres 2015 während der 8-tägigen Lagerung.	XXVI
Tabelle B-11:	Nachgewiesene Antibiotikagehalte im Boden nach der Ernte der Möhren.	XXVII
Tabelle B-12:	Nachgewiesene Antibiotikagehalte in den einzelnen Bodenschichten der Lysimeter.	XXVIII
Tabelle C-1:	Im Rahmen der Methodenentwicklung bestimmte absolute Wiederfindungen in Bezug auf Lösungsmittelstandards (Eluentengemisch).	XXIX
Tabelle C-2:	Methoden zum Nachweis von Tetracyclinen und Sulfonamiden in Umwelt-, Futtermittel- und Lebensmittelproben.	XXX
Tabelle C-3:	Methoden zum Nachweis von Tetracyclinen und Sulfonamiden in Wasserproben.	XXXI
Tabelle C-4:	Auswahl einiger Studien zur Bestimmung der Halbwertszeiten (DT_{50}) und Eliminierungsraten von Antibiotika in Gülle.	XXXII
Tabelle C-5:	Zusammenstellung maximaler Antibiotikagehalte in verschiedenen Bodentiefen aus Literaturdaten.	XXXIII
Tabelle C-6:	Mittelwerte bzw. Spannweiten von Tetracyclin- und Sulfonamid-Konzentrationen in pflanzlichen Matrices aus verschiedenen Studien.	XXXIV
Tabelle C-7:	Fortführung der Tabelle C-6	XXXV
Tabelle C-8:	Fortführung der Tabelle C-6	XXXVI
Tabelle C-9:	Fortführung der Tabelle C-6	XXXVII
Tabelle C-10:	Konzentrationen verschiedener Sulfonamide und Tetracycline in Wässern.	XXXVIII

Abkürzungsverzeichnis

ADI	Acceptable Daily Intake
AMG	Arzneimittelgesetz
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BG	Bestimmungsgrenze
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CTC	Chlortetracyclin
DIMDI	Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information
DOM	Dissolved Organic Matter, gelöste organische Substanz
DOX	Doxycyclin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Erfassungsgrenze
EMA	European Medicines Agency, Europäische Arzneimittelbehörde
ESI	Electrospray Ionisation
ESVAC	European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption
FA	Formic Acid, Ameisensäure
FM	Frischmasse
GLP	Gute Laborpraxis
HLNUG	Hessisches Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Geologie
(U)HPLC	(Ultra)-High-Performance-Liquid-Chromatography
iso-CTC	Isoform des Chlortetracyclins
ISTD	Interner Standard
KG	Körpergewicht
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LLH	Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen
MRI	Max Rubner-Institut
MRL	Maximum Residue Limit
n	Anzahl der Messungen
<i>N</i> -Acetyl-SMX	acetyliertes Sulfamethoxazol
<i>N</i> -Acetyl-SMZ	acetyliertes Sulfamethazin
NG	Nachweisgrenze
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
NRKP	Nationaler Rückstandskontrollplan
PEC	Predicted Environmental Concentration
SMX	Sulfamethoxazol
SMZ	Sulfamethazin
SOM	Soil Organic Matter, organische Bodensubstanz
TM	Trockenmasse
UBA	Umweltbundesamt
V_k	Variationskoeffizient
WDF	Wiederfindungsrate

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Gesamtkreislauf der über Güllendüngung in landwirtschaftliche Nutzflächen eingetragenen Veterinärantibiotika betrachtet. Das Verhalten der Wirkstoffe während praxisnaher Güllevorbehandlungen, deren Persistenz und Verlagerungsverhalten in landwirtschaftlichen Nutzböden, deren Aufnahme aus dem Boden in Nutz- und Gemüsepflanzen (Deutsches Weidelgras, Möhren), sowie deren Infiltrationsverhalten mit dem Bodensickerwasser in Richtung Grundwasser wurden ausführlich untersucht. Hierzu wurden Aufwuchs- und Lysimeterstudien durchgeführt, sowie hessische Grundwässer im Rahmen eines Routinemessprogramms auf ihren Antibiotikagehalt analysiert. Für die Studien wurde sich auf so genannte Altwirkstoffe fokussiert, die im Zuge ihres Zulassungsverfahrens keiner ökotoxikologischen Bewertung unterzogen wurden.

Eine Multimethode zum simultanen Nachweis ausgewählter Antibiotika aus der Wirkstoffgruppe der Tetracycline (Chlortetracyclin, Doxycyclin) und Sulfonamide (Sulfamethazin, Sulfamethoxazol) mittels Ultra-High-Performance-Liquid-Chromatography-Tandem-Massenspektrometrie (UHPLC/MS-MS) wurde für die Matrices Gülle, Weidelgras, Möhren und Wasser entwickelt, optimiert und validiert. Die Methode wurde zusätzlich um die Hauptmetabolite (*N*-Acetyl-Sulfamethazin, *N*-Acetyl-Sulfamethoxazol) und ein Transformationsprodukt (iso-Chlortetracyclin) erweitert. Die Richtigkeit der angewandten kombinierten Mess- und Aufarbeitungsmethode wurde durch die Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen durch ein erfolgreiches Abschneiden ($|\text{z-Scores}| < 2$) bestätigt.

Um erstmals die Belastung hessischer Grundwasserproben in Bezug auf die ausgewählten Antibiotika abschätzen zu können, wurden routinemäßig Grundwässer (~ 500 pro Jahr) im Auftrag des Hessischen Landesamtes für Naturschutz, Umwelt und Geologie (HLNUG) analysiert. Hierbei zeigte sich, dass ca. 4 % der untersuchten Proben einen Antibiotikagehalt oberhalb der Bestimmungsgrenze von 50 ng L^{-1} enthielten, die maximale Konzentration betrug 1.703 ng L^{-1} . Der Wirkstoff Sulfamethoxazol wurde am häufigsten gefunden.

Über Lysimeterstudien wurde die Verlagerung der Wirkstoffe mit dem Bodensickerwasser untersucht, nachdem antibiotikahaltige, fermentierte Rindergülle einmalig unter praxisüblichen Mengen oberflächlich als Düngemittel auf den Boden aufgebracht wurde. Für die Studie wurden zwei typische Böden Nordhessens gewählt (Baunataler Löß, Volkmarser Sand). Die Bewässerung erfolgte an fünf Tagen pro Woche mit deionisiertem Wasser. In den wöchentlich aufgefangenen Bodeneluatn wurde als einziger Wirkstoff Sulfamethazin nachgewiesen. Die Verlagerungsfrachten über den zweijährigen Untersuchungszeitraum betragen deutlich weniger als 1 % der aufgegebenen Wirkstoffmenge. Der Sandboden zeigte eine höhere Durchlässigkeit als der Lößboden. Um eine Aussage über den Verbleib der Antibiotika im Boden treffen zu können, wurde die Probenaufarbeitungsmethode für die Matrix „Boden“ erweitert. Die Lysimeterböden wurden schichtweise in Abständen von 5 cm untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass die Tetracycline im Oberboden (0 – 5 cm) zurückgehalten werden.

Die Durchführung der Carry-over-Studien erfolgte in Mitscherlichgefäßen fruchtangepasster Größe. Im ersten Aufwuchsjahr wurde Weidelgras auf den beiden Böden Baunataler Löß und Volkmarser Sand kultiviert. Die Antibiotikazufuhr erfolgte vor der Aussaat der Pflanzen über fermentierte Rindergülle in drei verschiedenen Konzentrationen. Als einziger Wirkstoff konnte Sulfamethazin in den oberirdisch geernteten Halmen des Weidelgrases nachgewiesen werden. Die Konzentrationen in der Pflanze stiegen mit der zur Verfügung stehenden Wirkstoffmenge im Gülle-Boden-Gemisch an. Pflanzen, die auf Sandboden kultiviert wurden, wiesen deutlich höhere Rückstandskonzentrationen an Sulfamethazin auf (bis $218 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ im 100 mg kg^{-1} -Ansatz) als vergleichbare Ansätze mit Lößboden (bis $48 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ im 100 mg kg^{-1} -Ansatz).

Um das Aufnahme- und Verteilungsverhalten in Gemüsepflanzen zu untersuchen, wurden im zweiten Aufwuchsjahr Möhren als Saatzpflanze ausgewählt. Als Versuchsboden wurde Volkmarser Sandboden verwendet. Der Antibiotikaeintrag erfolgte ebenfalls über dotierte Rindergülle. Diese wurde auf zwei verschiedene Arten vorbehandelt (8-tägige aerobe Lagerung, 40-tägige anaerobe Fermentation). Die Pflanzenkompartimente wurden einzeln untersucht. Tetracycline konnten lediglich in den Wurzeln und der Schale nachgewiesen werden, während Sulfonamide bis in die oberirdischen Pflanzenteile verlagert wurden. Die Verteilung der Wirkstoffkonzentrationen innerhalb der Pflanze ergab sich wie folgt: Wurzeln > Schale > Blätter > Rübe. Die Düngung mit fermentierter Gülle führte zu tendenziell höheren Wirkstoffrückständen in den Aufwuchspflanzen. Das Eliminierungsverhalten der Antibiotika im Zuge der Güllevorbehandlungen wurde ebenfalls untersucht. Hierzu wurden über den gesamten Lagerungs- und Fermentationszeitraum Gülleproben entnommen und analysiert. Hierbei zeigte sich eine Abnahme der Wirkstoffkonzentrationen in Abhängigkeit der Dauer, der Temperatur und des Sauerstoffgehaltes. Im Falle des (Epi)-Chlortetracyclins konnte die Bildung des (Epi)-iso-Chlortetracyclin beobachtet werden. Sulfamethoxazol zeigte die höchsten Eliminierungsraten. Die Substanz war nach der 40-tägigen Fermentation nicht mehr quantifizierbar.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass ein komplexes Zusammenspiel aus Stoffeigenschaften, Umwelteinflüssen, Bodenbeschaffenheit, Güllevorbehandlungsart, Pflanzenart und Pflanzenmorphologie das Verteilungs-, Aufnahme- und Akkumulationsverhalten ausgewählter Veterinärantibiotika in verschiedenen Umweltmedien bestimmen.

Abstract

In the present work the entire cycle of the fate and behavior of selected veterinary antibiotics entering the environment via liquid manure fertilization was investigated. The behavior of the active ingredients during practical liquid manure pretreatments, their persistence and displacement behavior in agricultural soils, their uptake from soil in agricultural crops and vegetable plants (perennial ryegrass, carrots), as well as their infiltration behavior with the soil interstitial water towards groundwater were comprehensively studied. For this purpose, growth and lysimeter studies were carried out, and Hessian groundwater was routinely analyzed for its antibiotic content. For all studies, the focus was placed on antimicrobials, which were not subjected to any ecotoxicological evaluation in the course of their admission procedure.

A multi-method for the simultaneous determination of selected antibiotics from the antimicrobial group of tetracyclines (chlortetracycline, doxycycline) and sulfonamides (sulfamethazine, sulfamethoxazole) by means of ultra-high-performance-liquid-chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC / MS-MS) was developed, optimized and validated for the matrices liquid manure, ryegrass, carrots and water. The method has been extended for relevant metabolites (*N*-acetyl-sulfamethazine, *N*-acetyl-sulfamethoxazole) and a transformation product (iso-chlortetracycline). The accuracy of the applied combined measurement and refurbishment method was confirmed by the successful participation in several proficiency tests ($|z\text{-scores}| < 2$).

In order to estimate the contamination of Hessian groundwater samples with selected antibiotics, groundwater samples (~ 500 per year) were routinely analyzed. On behalf of the HLNUG, this was performed for the first time in Hesse. It was found that about 4 % of the examined samples contained an antibiotic content above the quantification limit of 50 ng L⁻¹, the maximum concentration was 1,703 ng L⁻¹. Sulfamethoxazole was detected most often.

By means of lysimeter studies, the transfer of selected veterinary antibiotics with the soil leachate was investigated. Therefore antibiotic-containing, fermented cattle manure was superficially applied for one time to the soil as a fertilizer following good agricultural practice. For the studies two typical soils of North Hesse were chosen (Volkmarser sand, Baunataler loess). Irrigation was done five days a week with deionized water. Sulfamethazine was solely detected in the weekly collected soil eluates. The mass transfer over a two-year study was far below than 1 % of the added amount. The sandy soil showed a higher permeability than the loess soil. In order to be able to make a statement about the dislocation of the antibiotics in the soil, the sample preparation method was extended for the matrix "soil". The lysimeter soils were examined in defined layers. Tetracyclines were restrained in topsoil (0 – 5 cm).

Carry-over studies were performed in Mitscherlich-vessels. In the first growing season ryegrass was cultivated on two different soils (Volkmarser sand, Baunataler loess). Antibiotics were added before sowing via fermented cattle manure in three different concentrations. Sulfamethazine could be detected in the above-ground blades of ryegrass. The concentrations in the

plant increased with the added amount of antimicrobial in the slurry-soil mixture. Plants cultivated on sandy soil showed considerably higher residue concentrations of sulfamethazine (up to $218 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ in the 100 mg kg^{-1} batch) than comparable approaches with Loess soil (up to $48 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ in the 100 mg kg^{-1} batch).

In order to investigate the uptake and distribution behavior of antibiotics in vegetables, carrots were selected as important plants in the second year of growth. As test soil Volkmarsersand was used. Again, the antibiotics were added via enriched cattle manure. The liquid manure was pretreated in two different ways (8-day aerobic storage, 40-day anaerobic fermentation). The plant compartments were individually examined. Tetracyclines could be detected only in the roots and the peel, while sulfonamides were transferred to the above-ground parts of the plant. The distribution of drug concentrations within the plant was as follows: roots > peel > leaves > turnip. Fertilization with fermented liquid manure led to higher residual concentrations in the mature plants. The elimination behavior of the antibiotics in the course of liquid manure pretreatments was also investigated. For this purpose, liquid manure samples were taken and analyzed over the entire storage and fermentation period. The results showed a decrease in drug concentrations depending on duration, temperature and oxygen amount. In the case of (epi)-chlortetracycline, the formation of (epi)-iso-chlortetracycline was observed. Sulfamethoxazole showed the highest elimination rate. The substance was not quantifiable after 40 days of fermentation.

In summary, it should be noted that a complex interaction of active ingredient properties, environmental influences, soil conditions, liquid manure pretreatments, plant species and plant morphology determines the distribution, uptake and accumulation behavior of selected veterinary antibiotics in various environmental media.

1 Einleitung

1.1 Antibiotika und deren Verwendung in der Nutztierhaltung

Mit dem Begriff „Antibiotika (griechisch *anti*: gegen; *bios*: das Leben)“ wurden ursprünglich von Mikroorganismen (Bakterien, Pilze) produzierte Substanzen bezeichnet, die andere Mikroorganismen in ihrem Wachstum hemmen (bakteriostatische Wirkung) oder abtöten (bakterizide Wirkung) können. Diese Definition wurde im Laufe der Jahre um synthetisch und halb-synthetisch hergestellte Antibiotika erweitert, die zuvor unter dem Begriff „Chemotherapeutika“ zusammengefasst wurden (Winckler et al., 2004). Zu den natürlichen Antibiotika zählen beispielsweise die von Alexander Fleming im Jahre 1929 entdeckten Penicilline, welche von Pilzen der Gattung *Penicillium chrysogenum* produziert werden. Sulfonamide zählen zu den synthetisch hergestellten Antibiotika (Kümmerer, 2009). Der erste Arzneistoff aus der Gruppe der Sulfonamide war das Prontosil, dessen antibakterielle Wirkung 1935 von Gerhard Domagk entdeckt wurde (Domagk, 1935; Grundmann, 2001). Antibiotika werden in der Veterinärmedizin für die Therapie bakterieller Infektionskrankheiten weltweit in großen Mengen (ca. 742 t in Deutschland, siehe **Tabelle 1-1**) eingesetzt (Awad et al., 2014; Boxall et al., 2004; BVL, 2017). Sie unterliegen dem Arzneimittelgesetz und sind verschreibungspflichtig. Insbesondere in der intensiven Tierhaltung sind neben der therapeutischen Gabe auch metaphylaktische Behandlungen ganzer Tierbestände häufig. Hierdurch werden auch nicht erkrankte Tiere einer medikamentösen Behandlung unterzogen. Dem Ausbruch von Krankheiten, welcher mit dem Verlust zahlreicher Tiere einhergehen kann, soll so entgegengewirkt werden (Mohring et al., 2009). Die metaphylaktische Behandlung sieht die Verabreichung von Veterinärantibiotika an die ganze Tierherde vor, wenn eine kleine Anzahl von Tieren Symptome einer Erkrankung zeigt und belegt werden kann, dass der Erreger die noch gesunden Tiere infizieren kann. Zudem war vor 2006 der Einsatz von Veterinärantibiotika als Wachstums- und Leistungsförderer in der Tiermast in Europa weit verbreitet (Kumar et al., 2005a). Hierbei erfolgte die Verabreichung als Futterzusatzstoff in subtherapeutischen Konzentrationen um die Futtereffizienz zu verbessern und so das Wachstum der Tiere zu fördern. Dadurch konnte – vor allem bei unzureichender Stallhygiene – eine schnellere und kostengünstigere Aufzucht der Nutztiere ermöglicht werden (Boxall et al., 2003). Als Futterzusatzstoffe unterlagen diese den rechtlichen Bestimmungen des Futtermittelgesetzes und dem Zulassungsverfahren gemäß Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 (VO (EG) Nr. 1831/2003, 2003). Ein Problem der subtherapeutischen Gaben besteht möglicherweise in der Förderung der Entwicklung von Resistenzgenen in der Umwelt (Smith et al., 2002), weshalb der Einsatz von Veterinärantibiotika als Wachstums- und Leistungsförderer in der Tiermast zum 1. Januar 2006 europaweit verboten wurde (Christian et al., 2003). In weiten Teilen der Welt (z.B. USA, China und Brasilien) ist dies immer noch gängige Praxis. In den USA sind beispielsweise weiterhin insgesamt zehn Antibiotika als Leistungsförderer zugelassen, darunter Chlortetracyclin (Arikan et al., 2009b; Sarmah et al., 2006).

1.2 Verbrauchserhebungen

Antibiotika werden in hohen Tonnagen für die Gesunderhaltung von Mensch und Tier eingesetzt. Der weltweite Antibiotikaverbrauch in der Veterinärmedizin wurde im Jahr 2010 auf 63.200 Tonnen geschätzt. Bis 2030 wird ein Anstieg auf 105.600 Tonnen erwartet (Center for Disease Dynamics, Economics & Policy, 2015; van Boeckel et al., 2015; Wise, 2002).

Verkaufsmengen von Tierarzneimitteln in der Europäischen Union werden seit 2010 in einem Projekt der European Medicines Agency (EMA) mit dem Titel European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC) aufgelistet. Die aktuellsten Daten stammen aus dem Jahr 2015. Demnach wurden insgesamt 8.360 t Antibiotika in der EU verkauft (EMA, 2017). Für Deutschland liegen seit sieben Jahren genauere Informationen zu Antibiotika-Abgabemengen vor (**Kapitel 1.2.1**).

1.2.1 Abgabemengen von Veterinärantibiotika in Deutschland

Seit 2011 sind pharmazeutische Unternehmen und Großhändler gesetzlich verpflichtet die an Tierärzte abgegebenen Antibiotika zu melden. Das Arzneimittelgesetz (AMG) und die DIMDI-Arzneimittel-Verordnung (DIMDI-AMV) bilden hierzu die Rechtsgrundlagen. Die Daten werden über das Tierarzneimittel-Abgabemengenregister beim Deutschen Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) erfasst und vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) im Folgejahr veröffentlicht. Bei Betrachtung der übermittelten Daten (**Tabelle 1-1**), hat sich die Gesamt-Abgabemenge zwischen den Jahren 2011 und 2016 von 1.706 t auf 742 t um 56,5 % verringert. Dennoch sind dies bedeutende Mengen.

Tabelle 1-1: Vergleich der Antibiotika-Abgabemengen von 2011 bis 2016 (BVL, 2017).

Wirkstoffklasse	Abgabemenge [t]					
	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Aminoglycoside	47	40	39	38	25	26
Cephalosporine der 1. Generation	2,0	2,0	2,0	2,1	1,9	2,0
Cephalosporine der 3. Generation	2,1	2,5	2,3	2,3	2,3	2,3
Cephalosporine der 4. Generation	1,5	1,5	1,5	1,4	1,3	1,1
Fenicole	6,1	5,7	5,2	5,3	5,0	5,1
Fluorchinolone	8,2	10,4	12,1	12,3	10,6	9,3
Folsäureantagonisten	30	26	24	19	10	9,8
Lincosamide	17	15	17	15	11	k. A.
Makrolide	173	145	126	109	52	55
Penicilline	528	501	473	450	299	279
Pleuromutiline	14	18	15	13	11	9,9
Polypeptid-Antibiotika	127	124	125	107	82	69
Sulfonamide	185	162	152	121	73	69
Tetracycline	564	566	454	342	221	193
Summe	1706	1619	1452	1238	805	742

Die aktuellsten Zahlen stammen aus dem Jahr 2016 (**Abbildung 1-1**). Aus den Daten geht hervor, dass 2016, wie in den Jahren zuvor, die Wirkstoffgruppe der Penicilline am häufigsten an deutsche Tierärzte abgegeben wurde. Die jährliche Abgabemenge betrug rund 279 t, dies entspricht 37,6 % der gesamten Abgabemenge. Darauf folgten Tetracycline mit 193 t (26 %), Polypeptid-Antibiotika und Sulfonamide mit je 69 t (9,3 %) sowie Makrolide mit 55 t (7,4 %). Der Vergleich mit anderen europäischen Ländern zeigt, dass Tetracycline, Sulfonamide und β -Lactam-Antibiotika auch dort die mengenmäßig am häufigsten eingesetzten Wirkstoffgruppen darstellen (Grave et al., 2010).

Insbesondere Fluorchinolone und Cephalosporine der 3. und 4. Generation gelten als sogenannte „Reserveantibiotika“ im Humanmedizinbereich (WHO, 2011). Sie wirken – zumindest in den meisten Fällen – noch gegen multiresistente Keime. Der Einsatz dieser Wirkstoffe in der Tierhaltung ist gemäß den Leitlinien der Bundestierärztekammer „für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln“ restriktiv zu handhaben (BTK, 2015; Schramm et al., 2017). Die Abgabemengen der Fluorchinolone stiegen von 8,2 Tonnen im Jahr 2011 auf 9,3 Tonnen im Jahr 2016 an (Steigerung um 13 %). Dieser Trend wird als sehr kritisch eingestuft.

Die erhobenen Daten lassen jedoch nur bedingt Rückschlüsse auf die tatsächlichen regionalen Verbrauchsmengen zu. Auch zu welcher Behandlung, bei welcher Tierart und in welcher Dosierung ein bestimmtes Präparat eingesetzt wurde, lässt sich nicht rückverfolgen. Lediglich für Masttiere ab einer bestimmten Bestandsgröße wird die Therapiehäufigkeit seit Juli 2014 halbjährlich erfasst und den Behörden der Länder zur Verfügung gestellt. Dies basiert auf der 16. AMG-Novelle. Einige Studien stellten zudem heraus, dass der größte Anteil der verbrauchten Antibiotika auf die Nutztierhaltung (99 %) entfällt (BfR, 2016b; Wallmann et al., 2016).

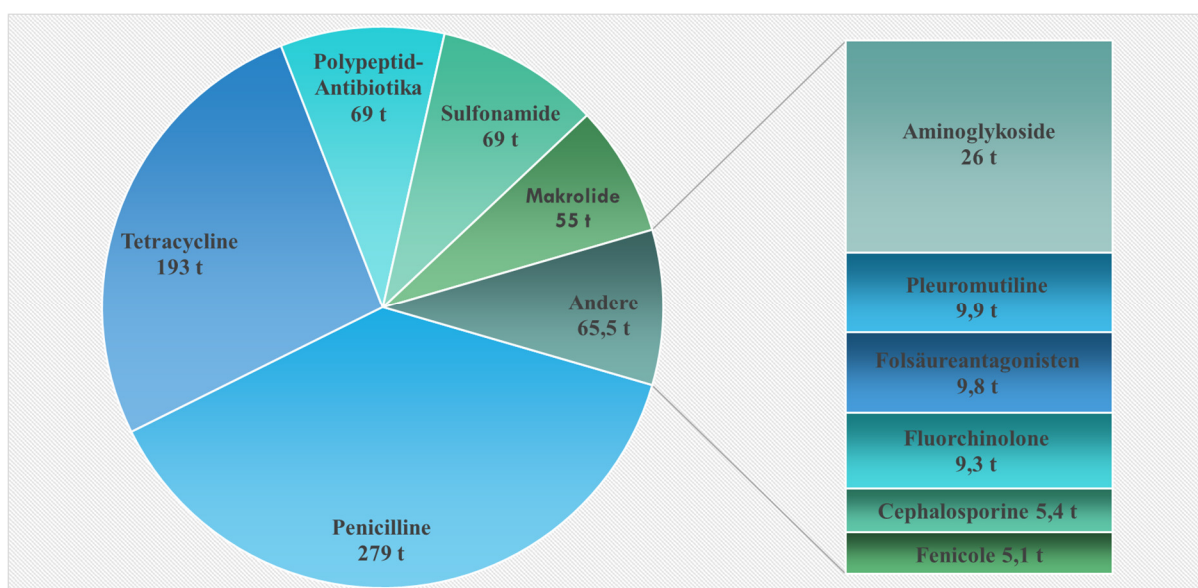


Abbildung 1-1: Antibiotika-Abgabemengen an Tierärzte im Jahr 2016 (BVL, 2017).

1.3 Rechtliche Regelungen zu Veterinärantibiotika

Das Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz - AMG) regelt auf nationaler Ebene die Zulassung und das Inverkehrbringen von Arzneimitteln für die Anwendung an Mensch und Tier (AMG, 2017). Auf europäischer Ebene regelt die Richtlinie 2001/82/EG die Durchführung von Umweltverträglichkeitsprüfungen bei der Neuzulassung von Arzneimitteln innerhalb der europäischen Union (Richtlinie 2001/82/EG, 2001; Spielmeyer et al., 2017a).

1.3.1 Zulassungsverfahren

Im Rahmen der Zulassung neuer Arzneimittel ist laut Gesetz – neben Angaben zu der Unbedenklichkeit für Mensch und Tier, der Wirksamkeit und der Qualität – eine Bewertung des Umweltverhaltens verpflichtend (§ 22 (3c) AMG; Richtlinie 2001/82/EG). Unternehmen, die das Arzneimittel in Verkehr bringen möchten, müssen die Umweltrisikobewertung vornehmen. Die Bewertung der eingereichten Daten obliegt in Deutschland dem Umweltbundesamt (UBA). Für die Zulassung ist das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) zuständig. Bei der Identifizierung eines Umweltrisikos kann die Substanz mit Auflagen zum Schutz der Umwelt zugelassen werden (§ 28 AMG). Das Vorgehen bei der Durchführung von Umweltverträglichkeitsprüfungen für Tierarzneimittel ist seit 1998 europaweit einheitlich über EMA-Leitfäden geregelt (EMA, 2016). Im ersten Schritt ist demnach die erwartete Konzentration eines Wirkstoffes in der Umwelt (**Predicted Environmental Concentration, PEC**) unter Berücksichtigung der Einsatzmengen zu ermitteln. Werden hierbei bestimmte Schwellen- bzw. Triggerwerte überschritten (z.B. $PEC_{\text{Boden}} \geq 100 \mu\text{g kg}^{-1}$) sind weitere ökotoxikologische Untersuchungen durchzuführen. Für zahlreiche sich derzeit auf dem Markt befindliche „Alt-Wirkstoffe/Präparate“, die vor der rechtlichen Verankerung der Forderung einer Umweltrisikobewertung im Zuge des Zulassungsverfahrens (1998) auf den Markt gebracht wurden, liegen keine ökotoxikologischen Risikoanalysen vor. Zu diesen „Alt-Wirkstoffen“ zählen auch die im Rahmen dieser Arbeit im Fokus stehenden Wirkstoffe Chlortetracyclin, Doxycyclin, Sulfamethazin und Sulfamethoxazol. Viele Autoren wiesen bereits vor geraumer Zeit auf die Bewertungslücken im Hinblick auf die Umweltrelevanz der Wirkstoffe hin (Hamscher et al., 2002; Tolls, 2001; Winckler and Grafe, 2001). Aufgrund dieser Erkenntnisse/Hinweise setzt sich das Umweltbundesamt derzeit für ein Altwirkstoffprogramm ein (Küster et al., 2013).

1.3.2 Rückstandshöchstmengen-Regelungen in Lebensmitteln und Grundwasser

Bislang sind lediglich für Lebensmittel tierischen Ursprungs (z.B. Fleisch, Eier, Milch, Honig) Rückstandshöchstmengen in Bezug auf pharmakologisch wirksame Stoffe über die Verordnung (EG) Nr. 470/2009 in Verbindung mit der Verordnung (EU) Nr. 37/2010 gesetzlich geregelt (VO (EG) Nr. 470/2009, 2009; VO (EU) Nr. 37/2010, 2010). Die festgelegten Rückstandshöchstmengen (**Maximum Residue Limit, MRL**) haben den gesundheitlichen Schutz des Verbrauchers zum Ziel. Zur Prüfung der Unbedenklichkeit der Lebensmittel wird seit 1989 die Einhaltung der Höchstmengen- bzw. Höchstgehalte, sowie der Einsatz verbotener und nicht

zugelassener Stoffe über Monitoring-Programme der Länder kontrolliert. Grundlage hierfür bildet der Nationale Rückstandskontrollplan (NRKP)¹ (BfR, 2016a). Darüber hinaus werden in Verbindung mit den Höchstmengen Wartezeiten festgelegt, die nach der Behandlung eines Tieres und der von diesem Tier gewonnenen Lebensmittel eingehalten werden müssen, um Wirkstoffrückstände in den Lebensmitteln zu vermeiden. Für pflanzliche Lebensmittel sind hingegen derzeit keine Grenzwerte gesetzlich geregelt.

Des Weiteren beinhaltet weder die deutsche Grundwasserverordnung (GrwV, 2017), noch die europäische Grundwasserrichtlinie (Richtlinie 2006/118/EG, 2006) Grenzwerte für Antibiotika. Aufgrund dessen werden derzeit keine Grundwasserproben systematisch im Rahmen von Monitoring-Programmen der Länder auf Antibiotikarückstände untersucht (Hannappel et al., 2016). Auch die Trinkwasserverordnung sieht keine expliziten Grenzwerte für Arzneimittel vor (TrinkwV, 2018), über § 6 (1) TrinkwV werden lediglich allgemeine Einschränkungen vorgenommen. Demnach dürfen im Trinkwasser chemische Stoffe nicht in gesundheitsschädlichen Konzentrationen enthalten sein. Im Zuge dessen gibt das Umweltbundesamt nach Anhörung der Trinkwasserkommission einen gesundheitlichen Orientierungswert (GOW) für bisher teil- oder nicht bewertbarer Stoffe in Höhe von $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ vor. Dieser dient lediglich als Vorsorgewert und lässt bei lebenslangem täglichen Konsum von 1 bis 2 Litern Trinkwasser keine gesundheitliche Gefährdung erwarten (UBA, 2003). Auch die Mineral- und Tafelwasser-Verordnung enthält derzeit keinen Grenzwert für Antibiotika².

1.4 Mögliche Eintragswege von Antibiotika in die Umwelt

Die kontinuierliche und hohe Antibiotikagabe in der Veterinär- und Humanmedizin macht es erforderlich die Eintragswege dieser Substanzen in die Umwelt näher zu untersuchen (**Abbildung 1-2**). Die Wirkstoffe werden z. T. unverändert und/oder metabolisiert vom Organismus ausgeschieden (Ratsak et al., 2013; Widyasari-Mehta et al., 2016a; Wolters et al., 2016). Humanarzneimittel gelangen in Industrieländern vor allem über die Kanalisation in die Kläranlagen. Werden die Substanzen in der Kläranlage durch die verschiedenen Reinigungsstufen nicht zurückgehalten bzw. eliminiert, können diese über geklärtes Abwasser in Oberflächengewässer gelangen (Hamscher et al., 2002; Kümmerer, 2004). Aus Veröffentlichungen geht hervor, dass nach der Medikation von Tierbeständen mit Antibiotika hohe Konzentrationen der verabreichten Wirkstoffe bzw. deren Metabolite in der Gülle nachweisbar sind (Elmund et al., 1971; Halting-Sørensen et al., 2002; Pan et al., 2011; Ratsak et al., 2013; Sarmah et al., 2006; Widyasari-Mehta et al., 2016a; Wolters et al., 2016) (**Kapitel 1.5**). Bevor die Ausbringung der Gülle auf landwirtschaftliche Nutzflächen erfolgt, wird diese gemäß der guten landwirtschaftlichen Pra-

¹ Im Rahmen des Nationalen Rückstandskontrollplanes wurden im Jahr 2014 insgesamt 17.572 Lebensmittelproben tierischen Ursprunges auf antibakteriell wirksame Stoffe untersucht. Lediglich 16 Proben (0,09 %) enthielten Gehalte oberhalb der vorgeschriebenen Rückstandshöchstmengen (BfR (2016a).

² Die allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Anerkennung und Nutzungsgenehmigung von natürlichem Mineralwasser (AVV, 2001) beinhaltet für PSM-Metabolite und Arzneimittelrückstände einen Orientierungswert von $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$. Dieser gilt als Kriterium für die Beurteilung der ursprünglichen Reinheit von natürlichem Mineralwasser, ist rechtlich jedoch nicht verbindlich (VGH Baden Württemberg, 2013).

xis einer mehrmonatigen Lagerung und/oder Fermentation unterzogen (**Kapitel 1.5.3**). Während dieser Vorbehandlung können in der Gülle enthaltene Antibiotika Eliminationsprozessen unterliegen, die durch den (a)biotischen Abbau und die Sorption an die Feststoffmatrix der Gülle bedingt sein können (Sztamári et al., 2011). Die Rückstandsgehalte an Tetracyclinen und Sulfonamiden in Gülle bewegen sich laut Literaturdaten im oberen $\mu\text{g kg}^{-1}$ - bis mittleren mg kg^{-1} -Bereich (Hamscher, 2008; Hamscher and Mohring, 2012; Widyasari-Mehta et al., 2016b). Bei der Nutzung von Gülle und Klärschlamm als Dünger werden folglich hohe Mengen an Antibiotika sowie deren Metabolite und ggf. auch Transformationsprodukte³ in den Boden eingetragen. Im Boden kann je nach Wirksamkeitseigenschaften die Sorption an Bodenminerale und/oder organischem Material eine große Rolle spielen und so eine Anreicherung der Wirkstoffe im Boden bewirken. Insbesondere gut wasserlösliche Verbindungen, welche möglicherweise zu einem Großteil im Bodenporenwasser verfügbar sind, können ggf. biotischen Abbauprozessen unterliegen. Eine Verlagerung dieser Substanzen vom Boden in das Grundwasser (leaching) und/oder deren Aufnahme in pflanzliche Lebensmittel (Carry-over) ist ebenfalls denkbar (Boxall et al., 2004; Dolliver et al., 2007; Grote et al., 2009; Kumar and Gupta, 2016; Tolls, 2001). Zudem kann ein Abfluss (run-off) von Ackerflächen in nahegelegene Oberflächengewässer aufgrund starker Regengüsse erfolgen (Bailey et al., 2015; Burkhardt et al., 2005; Davis et al., 2006; Kay et al., 2005). Durch die Anwendung von Antibiotika in der Fischzucht (Aquakultur) können ebenfalls Wirkstoffrückstände und Resistenzgene in Fischen und Fischmehl verbleiben. Auch in den Sedimenten unterhalb von Fischfarmen wurden bereits Antibiotikarückstände nachgewiesen (Samuelsen et al., 1992).

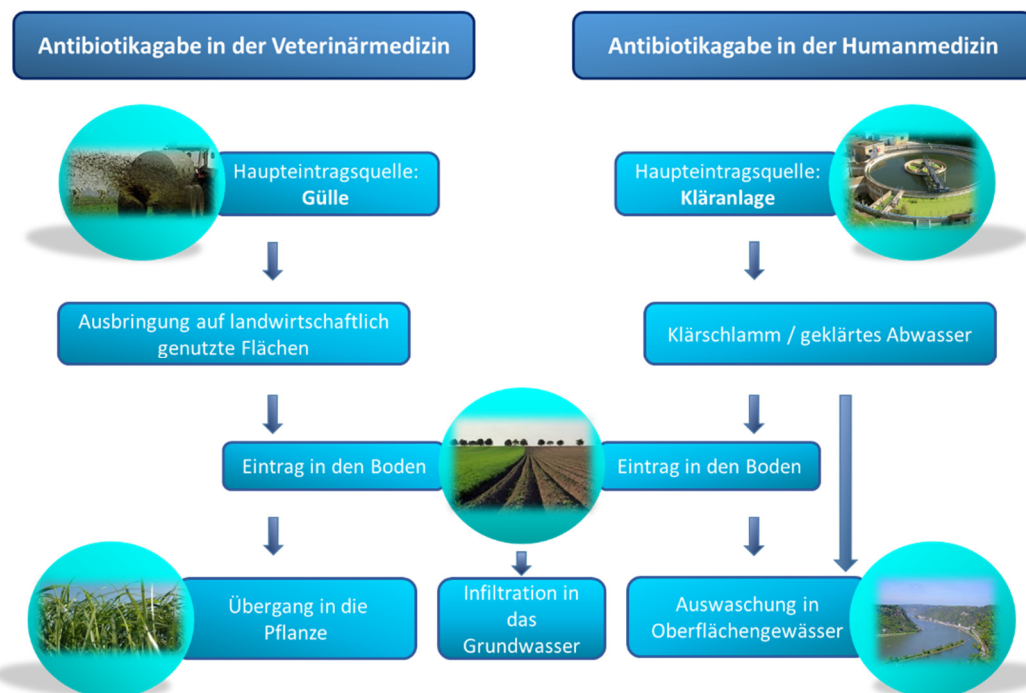


Abbildung 1-2: Mögliche Eintragungspfade von Antibiotika in die Umwelt durch deren Verwendung in der Human- und Veterinärmedizin.

³ Metabolit: entsteht im Körper des Zielorganismus und wird in die Umwelt exponiert; Transformationsprodukt: entsteht in der Umwelt bzw. in den Ausscheidungsprodukten der Zielorganismen, z.B. der Gülle (Hannappel et al., 2016).

Der Mensch kann somit einer unerwünschten Aufnahme von Antibiotika über die Nahrungsketten (v.a. über tierische und in geringem Maße pflanzliche Lebensmittel sowie Trinkwasser) ausgesetzt sein (Vockel, 2005). Hamscher et al. zeigten zudem, dass Staubpartikel in Schweineställen einen „Cocktail“ an Antibiotika enthalten können (Hamscher et al., 2003b). Insbesondere Landwirte und Tierärzte sind dieser ungewollten Antibiotika-Exposition über das Einatmen von Stallstäuben ausgesetzt.

1.5 Antibiotikarückstände in Rindergülle

Laut Düngegesetz ist Gülle definiert als *„Wirtschaftsdünger aus allen tierischen Ausscheidungen, auch mit geringen Mengen Einstreu oder Futterresten oder Zugabe von Wasser, dessen Trockensubstanzgehalt 15 vom Hundert nicht übersteigt“* (DüngG, 2017). Gülle stellt somit ein sehr inhomogenes Gemisch aus festen und flüssigen Bestandteilen dar. Die hohen und kontinuierlichen Antibiotikagaben in der Veterinärmedizin machen es erforderlich die Rückstände in der Gülle zu ermitteln, um Einträge über Düngemittel in die Umwelt abschätzen zu können. Basierend auf dem Verbrauch (**Abbildung 1-1**) ist davon auszugehen, dass jährlich tausende von Tonnen Antibiotika über Düngemittel weltweit in die Umwelt gelangen (Selvam and Wong, 2017)⁴. Da Gülle vor deren Ausbringung auf landwirtschaftliche Nutzflächen gelagert und vorbehandelt wird, ist somit die Untersuchung nach verschiedenen Güllelagerungen und Zeiten kurz vor deren Ausbringung sinnvoll. So können Aussagen über die Stabilität und Persistenz der Wirkstoffe im Zuge der Vorbehandlung getroffen werden. Zudem ist es möglich die Konzentrationen, welche tatsächlich über die Düngung in den Boden eingetragen werden, abzuschätzen. Dies kann nach dem Prinzip der vorhergesagten Umweltkonzentration erfolgen (PEC – **p**redicted **e**nvironmental **c**oncentration). Die detektierte Antibiotikakonzentration in der Gülle und die ausgebrachte Güllemenge können hierzu verwendet werden.

1.5.1 Tierische Ausscheidungsraten von Antibiotika

Die Ausscheidungsraten der Antibiotika werden maßgeblich von deren Molekülstruktur, der Dosierung, der Art der Verabreichung, der Tierart und dem Alter der Tiere bestimmt (Boxall et al., 2003; Kroker, 1983). Während rund 75 % bis 90 % der Tetracycline meist unmetabolisiert über Urin und Fäzes ausgeschieden werden (Kumar et al., 2005a; Winckler and Grafe, 2001), wurden für Sulfonamide geringere Ausscheidungsraten von ca. 50 % und das Auffinden von Mischungen der Ursprungssubstanzen und im Tier gebildeter Metabolite berichtet (Boxall et al., 2002; Kumar et al., 2005a; Winckler and Grafe, 2001). Nach der Verabreichung von Sulfamethazin an Schweinen waren beispielsweise noch 47 % dieses Antibiotikums in der Gülle nachweisbar. 50 % davon lag als Metabolit *N*-Acetyl-Sulfamethazin vor (Berger et al., 1986). Häufig sind metabolisierte Antibiotika antibiotisch nicht mehr aktiv. Heuer et al. beobachteten

⁴ In Europa werden über die Tierzucht jährlich 1.578 Millionen Tonnen Gülle und Festmist produziert. Für Deutschland werden 232 Millionen Tonnen jährlich angenommen (Holm-Nielsen et al., 2009).

jedoch bei den *N*-acetylierten Hauptmetaboliten von Sulfonamiden bereits Deacetylierungsprozesse im Laufe der Güllelagerung und einhergehend damit Rückumwandlungen in die antibiotisch aktiven Ausgangssubstanzen (Boxall et al., 2002; García-Galán et al., 2008; Heuer et al., 2011; Hirsch et al., 1999; Le-Minh et al., 2012). Der Großteil der Antibiotika aus den tierischen Exkrementen wird über die Güllendüngung in die Umwelt eingetragen (Wallace and Aga, 2016). Eine direkte Kontamination landwirtschaftlicher Nutzflächen kann durch Ausscheidungen von Weidevieh erfolgen (Jørgensen and Halling-Sørensen, 2000).

1.5.2 Nachgewiesene Antibiotikamengen in Gülle - Stand der Literatur

Aus bislang publizierten Daten aus Monitoringstudien zum Vorkommen von Antibiotika in tierischen Ausscheidungen geht hervor (**Tabelle A-1** und **Tabelle A-2**), dass sich Rückstandsgelhalte an Tetracyclinen und Sulfonamiden auch bei ordnungsgemäßem Antibiotikaeinsatz im oberen $\mu\text{g kg}^{-1}$ - bis mittleren mg kg^{-1} -Bereich bewegen (Blackwell et al., 2005; Hamscher and Mohring, 2012; Kumar et al., 2004; Wang et al., 2017; Widyasari-Mehta et al., 2016a). Häufig sind die Probenahmen anonymisiert, sodass nur wenige Daten zum Medikamenteneinsatz (Dosierung, Behandlungsdauer), dem Alter und Gewicht der behandelten Tiere, den Zeiten zwischen der letzten Gabe und der Probenahme oder den Lagerungsbedingungen der Gülle vorliegen, was einen direkten Datenvergleich nahezu unmöglich macht. Die in tierischen Ausscheidungen detektierten Gehalte sind um einiges höher als die Konzentrationen im Boden und in Oberflächengewässern (Dolliver et al., 2008). Gründe hierfür sind u.a. Verdünnungseffekte (z.B. Unterpflügen, Beimengungen von Wasser) oder Sorption, Abbau und Transformation der Wirkstoffe. In Deutschland sind insbesondere Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen Bundesländer mit hoher Viehbesatzdichte, sodass dort jährlich große Mengen an Gülle anfallen (Bäurle and Tamásy, 2012). Hamscher et al. wiesen in Schweinegülle, welche zur Beaufschlagung niedersächsischer Bodendauerbeobachtungsflächen eingesetzt wurde, 4 mg kg^{-1} Tetracyclin sowie $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ Chlortetracyclin nach (Hamscher et al., 2002). In anderen Studien untersuchten Hamscher et al. elf Schweine- und Rindergülleproben. In 73 % der Proben konnten Positivbefunde ermittelt werden. Rückstände an Tetracyclin und Chlortetracyclin wurden in einem Konzentrationsbereich von $0,1 - 45,3 \text{ mg kg}^{-1}$ detektiert. Epimerisierungs- und Isomerisierungsprodukte der Tetracycline wurden ebenfalls nachgewiesen. Auch Sulfadiazin bzw. Sulfamethazin waren bis zu einem Gehalt von $2,9 \text{ mg kg}^{-1}$ nachweisbar. Zudem waren bis zu vier Wirkstoffe in einer Probe enthalten (Hamscher et al., 2003a; Höper et al., 2002). Im Rahmen einer weiteren Studie wurden 344 Schweinegülleproben auf Rückstände von Sulfonamiden und Tetracyclinen untersucht. Die Gülleproben stammten aus Betrieben der Region Weser-Ems in Niedersachsen. In 76,5 % der Proben konnte mindestens ein Antibiotikum nachgewiesen werden. In 43 % der Proben lag mehr als ein Wirkstoff vor (Engels, 2004).

Die aufgeführten Antibiotikakonzentrationen welche in Gülle deutscher Landwirtschaftsbetriebe nachgewiesen werden konnten, stimmen sehr gut mit erhobenen Monitoringdaten anderer Länder überein. In Gülleproben Schweizer Landwirtschaftsbetriebe betragen die Rückstandskonzentrationen an Sulfamethazin, *N*-Acetyl-Sulfamethazin und Sulfathiazol in Summe $0,3 -$

23,7 mg kg⁻¹ (Haller et al., 2002). Auch in den Niederlanden konnten hohe Konzentrationen an Tetracyclinen in Gülle nachgewiesen werden (Berendsen et al., 2015). Studien aus Dänemark berichten von Maximalkonzentrationen an Chlortetracyclin in Schweinegülle bis 15,7 mg kg_{TM}⁻¹. Das Epimer des Chlortetracyclins konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Die Maximalkonzentration betrug 14,1 mg kg_{TM}⁻¹ (Jacobsen and Halling-Sørensen, 2006). In Österreich führte das Umweltbundesamt zahlreiche Gülleuntersuchungen durch. In Studien von Martínez-Carballo wurden beispielsweise 30 Schweinegülleproben von Mastanlagen auf Tetracycline und Sulfonamide untersucht. Für Chlortetracyclin konnten die Autoren einen Maximalgehalt von 46 mg kg⁻¹ ermitteln. Auch Sulfamethazin wurde in 18 von 30 Gülleproben nachgewiesen (Martínez-Carballo et al., 2007). In China wurden ebenfalls sehr hohe Antibiotikagehalte in Gülle analysiert. Etwa 210.000 Tonnen Antibiotika werden jährlich in China produziert, 48 % davon entfallen auf die Landwirtschaft und Viehwirtschaft (Luo et al., 2010). Zhou et al. untersuchten Ausscheidungen von Schweinen und Milchvieh verschiedener Farmen in Südchina. In drei Schweinefarmen konnten in Ausscheidungen von Ferkeln 78,1 – 97,6 mg kg⁻¹ Chlortetracyclin, 0,05 – 2,2 mg kg⁻¹ Doxycyclin und 0 bis 0,25 mg kg⁻¹ Sulfamethazin nachgewiesen werden. In Exkrementen von Sauen betrug der Gehalt an Chlortetracyclin 2,4 – 77,6 mg kg⁻¹, der Gehalt an Doxycyclin bewegte sich zwischen 0,02 und 0,3 mg kg⁻¹. Sulfamethazin war nicht oder im einstelligen µg kg⁻¹-Bereich (6,75 µg kg⁻¹) nachweisbar. Die Antibiotikakonzentrationen in Gülle von Milchvieh waren deutlich geringer. Hier betrug der Gehalt an Chlortetracyclin maximal 1,5 mg kg⁻¹. Die niedrigeren Gehalte im Vergleich zur Schweinegülle erklärten die Autoren u.a. über die Art der Antibiotikagabe. Diese erfolgte bei Schweinen über das Futter (Bestandsbehandlung), während das Milchvieh Antibiotika injiziert bekam (Einzeltierbehandlung) (Zhou et al., 2013). In China sind zudem zahlreiche Antibiotika, darunter Chlortetracyclin, als Wachstumsförderer erlaubt. Demnach sind die gefundenen Gehalte auch sehr stark von der Dosierung der Wirkstoffe, je nach dem Zweck der Anwendung (Wachstumsförderung, Prävention und Bekämpfung von Infektionskrankheiten, Futtermittelzusatzstoff), abhängig.

1.5.3 Güllevorbehandlung und Verarbeitung

1.5.3.1 Fermentation und Lagerung

Die Güllezusammensetzung in Bezug auf den Nährstoffgehalt, die organische Substanz sowie Mineralstoffen ist von zahlreichen Faktoren wie z.B. der Tierart, der Fütterung, der Zuleitung von Niederschlagswasser und der Dauer und Art der Güllelagerung abhängig. Ein Großteil der Gülle wird vor deren Ausbringung über mehrere Tage bis Monate einer anaeroben Fermentation (z.B. in Gülletanks) oder aeroben Lagerung (z.B. als Hofdung) unterzogen (Jørgensen and Halling-Sørensen, 2000; Oenema et al., 2007). In Europa beträgt die durchschnittliche Lagerungsdauer etwa drei Monate (Slana and Dolenc, 2013). Durch die Vorbehandlung soll insbesondere die Pflanzenverfügbarkeit des darin enthaltenen Stickstoffs und die Infiltrationseigenschaften der Gülle durch Abbau von Feststoffen verbessert werden. Zudem ist die Lagerung

insbesondere in Monaten, in denen gesetzlich vorgeschriebenes Düngeverbot herrscht (§ 6 Abs. 8 DüV), unabdingbar (DüV, 2017). Aus Monitoringdaten ist ferner ersichtlich, dass eine fermentative Güllevorbehandlung zu deutlich niedrigeren Rückstandskonzentrationen an Antibiotika führen kann (Motoyama et al., 2011) (vgl. **Tabelle A-1** und **Tabelle A-2**).

1.5.3.2 Verwendung in Biogasanlagen

Auch die Verwendung von Gülle als Co-Substrat für die wirtschaftliche Methanerzeugung in Biogasanlagen gewinnt zunehmend an Bedeutung (Weiland, 2010). Die Gärreste der Biogasproduktion werden ebenfalls als organische Düngemittel eingesetzt (Wolters et al., 2016). Insam et al. stellten die gesteigerte mikrobielle Aktivität und auch die verbesserte Ausbringung aufgrund der Homogenität als Vorteile der Verwendung fermentativer Rückstände als Düngemittel heraus (Insam et al., 2015). Weiterführend konnte bei der Verwendung von Gülle als Substrat für Biogasanlagen in den Fermentationsrückständen Antibiotika detektiert werden. Spielmeyer et al. zeigten jedoch, dass im Falle des Sulfamethazins und Chlortetracyclins die Antibiotikakonzentration im Güllesubstrat (input) deutlich höher war als in den Gärresten (output) der Biogasanlage (Ratsak et al., 2013; Spielmeyer et al., 2015; Spielmeyer et al., 2014; Widyasari-Mehta et al., 2016a). Einige Veterinärantibiotikarückstände in der Gülle können jedoch einen negativen Effekt auf die Methanproduktion haben und sind somit insbesondere in Gülle, welche als Co-Substrat in Biogasanlagen zugeführt werden soll, unerwünscht (Alvarez et al., 2010; Bauer et al., 2014; Lallai et al., 2002; Massé et al., 2000; Mitchell et al., 2013). So berichteten Alvarez et al. von einer Reduzierung der Methanproduktion von über 50 % welche durch die Anwesenheit von Chlortetracyclin und Oxytetracyclin in der Gülle induziert wurde (Alvarez et al., 2010). Auch Massé et al. untermauerten diese Erkenntnisse durch ähnliche Studien. So konnten sie zeigen, dass bei der Gabe von Penicillin und Tetracyclin an Schweine in deren höchstverordneten Konzentration die Methanproduktion um 35 % und 25 % reduziert wurde (Massé et al., 2000). Untersuchungen von Gans et al. zeigten zudem eine erhöhte Abnahme der Methanbildung (ca. 25 %) mit zunehmender Chlortetracyclinkonzentration ($200 \text{ mg kg}_{\text{TM}}^{-1}$) in der Gülle (Gans et al., 2010). Andere Antibiotika, darunter Sulfamethazin (getesteter Konzentrationsbereich: $0,28 - 280 \text{ mg L}^{-1}$) und Sulfamethoxazol (getesteter Konzentrationsbereich: $6 - 100 \text{ mg L}^{-1}$), zeigten keine signifikanten inhibitorischen Effekte auf die Methanproduktion (Gartiser et al., 2007; Mitchell et al., 2013; Mohring et al., 2009).

1.6 Antibiotikarückstände im Boden durch Eintrag von Gülle

Die Einarbeitung von Gülle in Ackerböden erfolgt nach guter landwirtschaftlicher Praxis im Frühjahr und Herbst. Sie dient der Nährstoffzufuhr zur besseren Bewirtschaftung und sollte gemäß den Nährstoffbedürfnissen des Bodens und des darauf angepflanzten Saatgutes angewandt werden (D'Angelo, 2017; Kumar et al., 2005a). Das organische Material und insbesondere die Anwesenheit von Stickstoff und Phosphor in der Gülle sollen das Wachstum von Pflanzen und die Qualität der landwirtschaftlichen Böden verbessern (Wong et al., 2017). In der Gülle enthaltene Antibiotika, aber auch (unbekannte) Metabolite und Transformationsprodukte, können durch den Einsatz von Gülle als organische Düngemittel in den Boden eingetragen werden (Hamscher et al., 2000; Jechalke et al., 2014; Tolls, 2001). Die Böden stellen einen natürlichen Filter für viele Schadstoffe dar und senken deren Bioverfügbarkeit im Naturkreislauf. Festlegungs-, Verlagerungs-, Abbau- und Transformationsprozesse sind hieran beteiligt.

1.6.1 Verhalten von Antibiotika im Boden

Die Verfügbarkeit von Antibiotika im Boden ist maßgeblich von deren Sorptionsneigung an Bodenbestandteile abhängig. Für das Sorptions- und Fixierungsverhalten von Antibiotika im Boden sind deren Wirkstoffeigenschaften wie Wasserlöslichkeit, Lipophilie, Flüchtigkeit und das Dissoziationsverhalten verantwortlich (Kumar et al., 2005b). Zudem spielen die physikalisch-chemischen Bodeneigenschaften wie der Gehalt an organischem Kohlenstoff, der Metalloidgehalt, die Ionenstärke der Bodenlösung, die Kationenaustauschkapazität und der Tongehalt, sowie die Bodentextur und der pH-Wert eine entscheidende Rolle (Chen et al., 2017; Doretto et al., 2014; Holten Lützhøft et al., 2000; Langhammer, 1989; Tasho and Cho, 2016; Thiele-Bruhn, 2003; Wegst-Uhrich et al., 2014). Durch die Sorption der Wirkstoffe an Bestandteile des Bodens, kann deren Mobilität und Reaktivität, sowie deren Bioverfügbarkeit für den mikrobiellen Abbau reduziert sein (Hatzinger and Alexander, 1997; Miller et al., 2016). Auch das antibiotische Potential der Wirkstoffe kann insbesondere durch die Beteiligung antibakteriell wirksamer Gruppen bei der Sorption und Fixierung an Böden herabgesetzt werden (Halling-Sørensen et al., 2003; Ingerslev and Halling-Sørensen, 2000). Zunächst lässt sich die Mobilität der Antibiotika im Boden über den Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient K_{ow} grob abschätzen (Wegst-Uhrich et al., 2014) (**Gl. 1-1**). Hierdurch wird die Löslichkeit einer Substanz in einem polaren bzw. unpolaren Lösungsmittel beschrieben. Er dient als Maß für die mögliche Anreicherung einer Substanz – z.B. in tierischen Fetten, pflanzlichen Wachsen oder in Huminstoffen des Bodens. Ein hoher K_{ow} -Wert kann, sofern keine Metabolisierung oder Transformation des jeweiligen Stoffes erfolgt, zu einer starken Bio- oder Geoakkumulation führen (Fent, 2007).

$$K_{OW} = \frac{c_{Oktanol}}{c_{Wasser}} \quad (\text{Gl. 1-1})$$

Der K_{ow} -Wert berücksichtigt insbesondere hydrophobe Wechselwirkungen und ist daher gut geeignet für die Vorhersage des Sorptionsverhaltens ungeladener, unpolarer Substanzen mit

log K_{ow} -Werten größer vier (Scheffer et al., 2010). Viele Veterinärantibiotika sind ionische Verbindungen mit Dissoziationskonstanten (pK_a -Werten) im pH-Bereich des Bodens. Die Wirkstoffe können daher in der Umwelt als negativ, neutral, zwitterionisch oder positiv geladene Spezies vorliegen. Je nach vorliegender Spezies können Interaktionen mit dem Boden über elektrostatische Anziehungen, Oberflächenkomplexierungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals Wechselwirkungen oder Kationenaustauschprozesse erfolgen (Thiele-Bruhn, 2003; Tolls, 2001). Diese werden insbesondere über die oben aufgeführten physikalisch-chemischen Bodenparameter beeinflusst. Der K_{ow} -Wert erfasst diese Interaktionen nicht und würde somit zu Fehleinschätzungen führen. Durch die Einbeziehung der Bodenmatrix lässt sich das Sorptionsverhalten besser beschreiben. Hierzu wird der Feststoff-Wasser-Verteilungskoeffizient K_d herangezogen (Gl. 1-2). Aus ihm lassen sich Vorhersagen über die Mobilität von Wirkstoffen in Böden ableiten. Mögliche Grundwassergefährdungen durch Infiltrationsprozesse oder Kontaminationen von Oberflächengewässern über Oberflächenabfluss können somit abgeschätzt werden. Per Definition ist der K_d -Wert ein Maß für die Verteilung eines Stoffes zwischen einer festen (c_{Boden}) - z.B. Partikel im Boden ($K_{d, \text{solid}}$) bzw. Partikel im Bodenwasser ($K_{d, \text{DOM}}$) - und wässrigen (c_{Wasser}) Phase im Gleichgewicht (Tolls, 2001):

$$K_d = \frac{c_{\text{Boden}}}{c_{\text{Wasser}}} \quad (\text{Gl. 1-2})$$

Substanzen mit hohen K_d -Werten binden stark an Bodenpartikel, ihre Bioverfügbarkeit für Pflanzen, sowie für den biotischen Abbau und ihr Infiltrationsverhalten in Richtung Grundwasser (Mobilität) wird daher als gering eingestuft. In der Literatur existieren viele verschiedene K_d -Werte für einen Wirkstoff. Dies wird mit den unterschiedlichen physikalisch-chemischen Bodenparametern begründet. Da eine Zunahme der Sorption von Wirkstoffen häufig mit dem organischen Kohlenstoffgehalt im Boden in Verbindung gebracht wird (Kahle and Stamm, 2007a; Lertpaitoonpan et al., 2009; Thiele, 2000; Thiele-Bruhn et al., 2004; Thiele-Bruhn, 2003; Tolls, 2001), ist in der Literatur auch der K_{oc} -Wert geläufig. Dieser normiert den K_d -Wert auf den organischen Kohlenstoffgehalt im Boden (in %) (Gl. 1-3):

$$K_{oc} = \frac{K_d}{c_{\text{org}}\%} \quad (\text{Gl. 1-3})$$

Die Einarbeitung von Gülle als Düngemittel kann die Sorptionseigenschaften beeinflussen (Thiele-Bruhn and Aust, 2004). Wie bereits in **Kapitel 1.5** aufgezeigt, ist Gülle ein sehr heterogenes Gemisch. Faktoren wie die Güllevorbehandlungstechnik (anaerobe / aerobe Bedingungen, Temperatur, Dauer, etc.), das Alter der Tiere und die Fütterung können einen Einfluss auf die Zusammensetzung (Trockenmasse, pH-Wert, Ammonium-Stickstoff Gehalt, Kationengehalt, Mikroorganismenzusammensetzung, organischer Kohlenstoffgehalt etc.) dieser Matrix nehmen. Die Antibiotikamengen, welche über die Gülleanwendung in die Umwelt eingetragen werden, sind von der verabreichten Wirkstoffdosis und der Ausscheidungsrate der Tiere abhängig. Auch die Frequenz der Gülledüngung beeinflusst die Rückstandskonzentrationen in dem gedüngten Boden. Durch eine Güllevorbehandlung können die ursprünglichen Wirkstoffe spezifischen Eliminierungs- und Abbauprozessen unterliegen, die je nach Vorbehandlungstechnik

teilweise oder vollständig stattfinden (vgl. **Kapitel 1.5** und dortige Literatur). Mit der Einarbeitung der Gülle in den Boden werden die beiden Matrices gemischt, wodurch sich die physikalisch-chemischen Gesamteigenschaften wieder verändern. So kann eine Einarbeitung von Gülle den pH-Wert des Bodens in den basischen Bereich verschieben und zudem den Gehalt an gelöster organischer Substanz, Ionen und Mikroorganismen erhöhen. Von dieser umgebenden Matrix wird das Umweltverhalten der über die Gülle in den Boden eingetragenen Antibiotikawirkstoffe mitbestimmt. **Tabelle 1-2** fasst einige K_d -Werte für Tetracycline und Sulfonamide in verschiedenen Böden zusammen.

Tabelle 1-2: Adsorptionskoeffizienten für Tetracycline und Sulfonamide in Böden.

Wirkstoffe	Bodenart Textur / pH/ C_{org} %	K_d [L kg ⁻¹]	K_{oc} [L kg ⁻¹]	Literatur
Tetracycline		290 – 1.620		(Tolls, 2001)
Oxytetracyclin	sandiger Lehm	680 – 1.030		(Aga et al., 2005)
	lehmgiger Sand / 6,1 / 1,6	680	425	(Rabølle and Spliid, 2000)
	Sand / 5,6 / 1,4	670	478,6	
	sandiger Lehm / 5,6 / 1,1	1.026	932,7	
	Sand / 6,3 / 1,5	417	278	
Tetracyclin	toniger Lehm	> 400		(Thurman and Lindsey, 2000)
Sulfonamide		0,6 – 4,9		(Tolls, 2001)
Sulfamethazin	toniger Lehm	0,6		(Thurman and Lindsey, 2000)
	Sand / 5,2/ 0,9	1,2	1,3	(Langhammer, 1989; Thiele-Bruhn, 2003)
	lehmgiger Sand / 5,6 / 2,3	3,1	1,3	
	sandiger Lehm / 6,3 / 1,2	2,0	1,7	
	lehmgiger Schluff / 6,9 / 1,1	1,0	0,9	(Thiele, 2000)
	schluffiger Lehm / 7,0 / 1,6	2,4	1,5	
	toniger Lehm / 6,2 / 3,1	3,0	1,0	
	sandiger Lehm / 5	6,9		(Tolls, 2001)
	sandiger Lehm / 7	5,1		
	sandiger Lehm / 9	0,9		
	Lehm / 5	18		(Wegst-Uhrich et al., 2014)
	Lehm / 7	5,3		
	Lehm / 9	0,9		
Sulfachloropyridazin	toniger Lehm / 6,5 / -	1,8		(Boxall et al., 2002)
	sandiger Lehm / 6,8 / -	0,9		

Auch die Einarbeitungstechnik der Gülle in den Boden spielt eine Rolle für die Wirkstoffverteilung im Boden (Boxall, 2004; Carrasquillo et al., 2008). So können oberflächlich aufgebraute Wirkstoffe einer Photodegradation oder Oberflächenabdrift durch starke Regengüsse unterliegen. Das Unterpflügen der Gülle verhindert dies, sorgt jedoch im Umkehrschluss für einen tieferen Eintrag in den Boden. Die Schwierigkeit bei der Untersuchung und Abschätzung des Umweltverhaltens von Wirkstoffen liegt in dem komplexen Zusammenspiel aller aufgeführten Parameter.

1.6.2 Bindungsarten von Antibiotika an Bodenpartikel

Ähnlich wie bei der Sorption anderer organischer Verbindungen wird die primäre Sorptionsreaktion von Antibiotika an Bodenpartikel häufig von einem reversiblen Gleichgewichtsprozess (Adsorption und Desorption) bestimmt. Hierbei spielen schwache Bindungsmechanismen wie z.B. Van-der-Waals-Wechselwirkungen, Komplexierungen, Ionenaustauschprozesse, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen eine Rolle (Chu et al., 2013; Gao and Pedersen, 2010; Schwarz et al., 2012; Srinivasan et al., 2014, 2013). Erfolgt die Desorption langsamer als die Adsorption, so spricht man von einer Sorptionshysterese (Wehrhan et al., 2010) (**Abbildung 1-3**). Mit zunehmender Kontaktzeit im Boden kann eine Diffusion der Antibiotika in die Zwischenschichten von Tonmineralen und Mikroporen⁵ stattfinden. Aufgrund der Einlagerungen sind die Wirkstoffe für Mikroorganismen nicht mehr zugänglich (Förster et al., 2009; Hamscher and Mohring, 2012; Thiele-Bruhn, 2003; Zarfl et al., 2009). Die Bioverfügbarkeit für den mikrobiologischen Abbau und die Verlagerung in tiefere Bodenschichten oder deren Aufnahme in Pflanzen sinkt, während die Verweildauer im Boden (Persistenz) steigt. Diese Einlagerungsprozesse in den Boden werden unter dem Begriff „Sequestrierung“ zusammengefasst. Allerdings zählt Sequestrierung zu den reversiblen Bindungsmechanismen. Eine langsame, kontinuierliche Freisetzung der über Sequestrierung gebundenen Antibiotika in eine bioverfügbare Form ist demnach möglich. Parallel zu den genannten reversiblen Prozessen der Sorption/Desorption und Sequestrierung kann ein Teil der Antibiotika nicht-extrahierbare Rückstände bilden. Die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände kann über die Bindung der Antibiotika an Metalloxyde, Tonminerale und organische Bodensubstanz erfolgen. Als Bindungsmechanismus werden kovalente Bindungen mittels aktiver Seitengruppen angenommen (Jechalke et al., 2014). Eine Akkumulation von Antibiotika im Boden über einen längeren Zeitraum ist möglich, wenn die eingetragenen Konzentrationen die Eliminierungs- oder Abbauraten übersteigen.

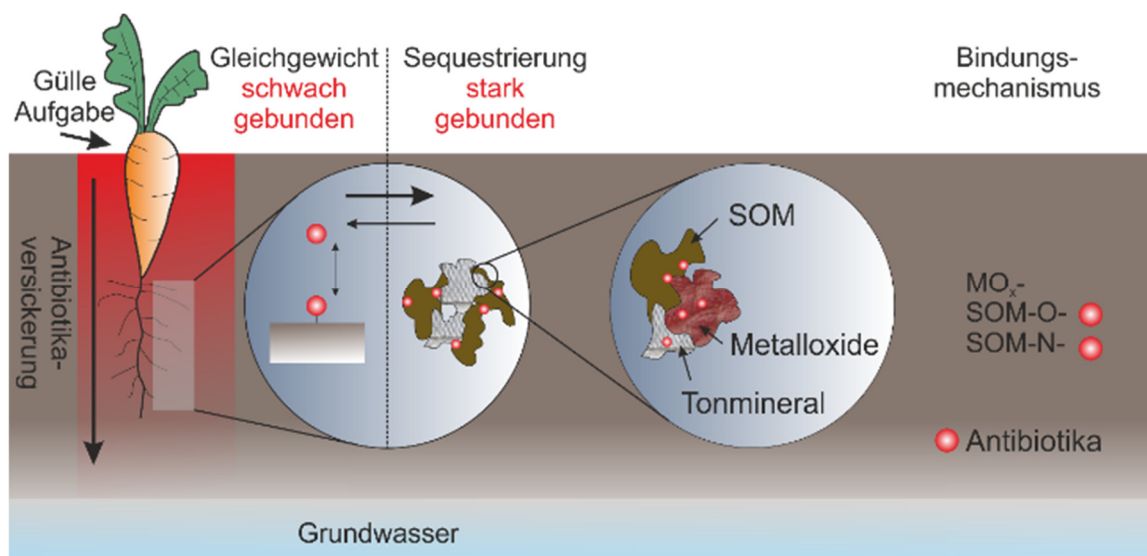


Abbildung 1-3: Bindungsverhalten von Antibiotika im Boden und dessen Kompartimenten. Modifiziert nach (Jechalke et al., 2014).

⁵Mikroporen: Poren, die einen Durchmesser von 2 nm nicht überschreiten (Nič et al., 2009).

1.7 Antibiotikarückstände in Pflanzen

1.7.1 Aufnahme von Antibiotika über das Wurzelsystem

Im Folgenden werden die pflanzlichen Transportmechanismen zur Aufnahme von Wasser und Nährstoffen aus der Bodenlösung erläutert (**Abbildung 1-4**). Der Wassertransport bei Pflanzenzellen wird durch Unterschiede im Wasserpotential zwischen der Wurzel und dem umgebenden Boden „angetrieben“. Mineralstoffe und Wasser können über aktive (unter Beteiligung von Transportproteinen und Energieverbrauch) und passive (Diffusion) Transportmechanismen über die Oberfläche der Wurzelepidermis in die Pflanze aufgenommen werden. Ausstülpungen an der Epidermis, wie Wurzelhaare und Mykorrhizen (symbiontische Strukturen aus Pflanzenwurzeln und Hyphen der Pilze), sorgen hierbei für eine Oberflächenvergrößerung und eine verbesserte Absorption. Der weitere Transport aus dem Epidermisbereich über die Wurzelrinde zum Zentralzylinder kann über drei unterschiedliche Wege erfolgen (**Abbildung 1-4**). Man unterscheidet den apoplastischen Weg über Zellwände und Extrazellulärräume, den symplastischen Weg über das Cytosol durch miteinander verbundene Plasmodesmen und den transmembranen Weg über Plasmamembranen und Zellwände.

Eine Translokation des aufgenommenen Wassers und der Mineralstoffe aus dem Wurzelbereich in die restlichen Bereiche der Pflanze (Blätter, Früchte) erfolgt über das Xylem-Leitgewebe des Zentralzylinders. Dieses besteht aus toten Zellen. Bevor die aufgenommenen Substanzen das Xylem erreichen, müssen sie die zwischen Wurzelrinde und Zentralzylinder liegende Endodermis passieren. Diese wirkt als „Schranke“ für den selektiven Übergang der Mineralstoffe ins Leitgewebe. Stoffe die über den symplastischen Weg die Endodermis erreichen, haben bereits eine selektiv permeable Membran der Epidermis oder der Wurzelrinde passieren müssen. Im Symplasten befindliche Stoffe können daher über die Plasmodesmen der Endodermiszelle in den Zentralzylinder eindringen. Schwieriger haben es Ionen, welche über den apoplastischen Weg zur Endodermis transportiert werden. In den Zellwänden der Endodermis befindet sich der sogenannte Caspary-Streifen. Dieser besteht aus wachsartigem Suberin und ist für Wasser und gelöste Mineralstoffe undurchlässig. Der einzige Weg diese Schranke zu überwinden besteht darin, die Plasmamembran der Endodermiszelle zu passieren und so über den Symplasten den Zentralzylinder zu erreichen. Hierdurch stellt die Pflanze sicher, dass aufgenommene Stoffe mindestens eine selektiv permeable Plasmamembran durchqueren, bevor sie in das Xylem eintreten und mit dem Xylemsaft in oberirdische Gewebe transportiert werden. Der Xylemsaft fließt von der Wurzel aufwärts zu den Blättern. Die Transpiration, sprich die kontrollierte Verdunstung von Wasser aus Blättern über die Schließzellen, sorgt für einen Sog, der den Xylemsaft aufwärts transportiert (Campbell et al., 2008).

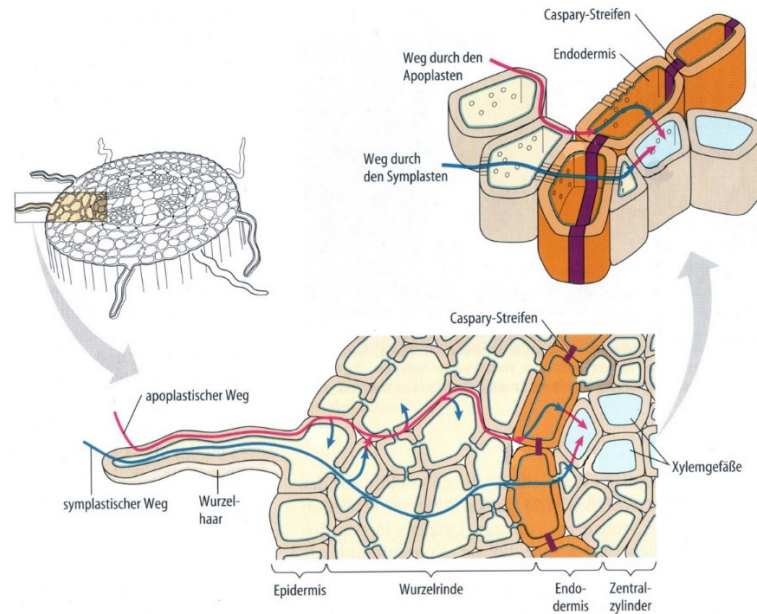


Abbildung 1-4: Transport von Mineralstoffen und Wasser in Wurzeln (Campbell et al., 2008).

1.7.2 Einflussfaktoren auf die Aufnahme von Schadstoffen in Pflanzen

Die Aufnahme der Antibiotika erfolgt aus dem Rhizosphärenbereich (Bodenzone um die Pflanzenwurzel (2 – 3 mm)) über die Wurzeloberfläche in die Pflanze. Über die Aufnahmemechanismen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Wirkstoffe liegen derzeit keine expliziten Kenntnisse vor. Passiven Transportprozessen wird hierbei jedoch die höchste Relevanz zugesprochen, welche durch die Transpiration angetrieben werden (Ciffroy et al., 2018; Doucette et al., 2018; Gobas et al., 2016; Mc Farlane, 1994; Paterson et al., 1990). Publierte Daten zu diesem komplexen Themengebiet sind teilweise sehr widersprüchlich. Trapp stellte die Komplexität der involvierten Prozesse als Gründe für die Wissenslücken auf diesem interdisziplinären Forschungsgebiet heraus. Die hohe Variabilität in Pflanzenmorphologie und -physiologie und die große Anzahl an Chemikalien mit vielen verschiedenen physikalisch-chemischen Eigenschaften sowie der Einfluss der Umweltbedingungen (Bodentyp (z.B. Korngröße), Bodenspezifikationen (z.B. organischer Kohlenstoffgehalt, Gehalt an Tonmineralen, pH-Wert, Feuchtigkeit), Klima) wurden beispielhaft genannt (Fantke et al., 2016; Trapp, 2004; Trapp and Legind, 2011). Generell wird angenommen, dass Stoffeigenschaften wie die molare Masse der Substanzen, deren pK_a -Wert und deren Lipophilie (ausgedrückt über den K_{ow} -Wert), sowie pflanzliche Charakteristika wie beispielsweise der Lipidgehalt in der Wurzel, die Ausbildung des Wurzelsystems, die Permeabilität der Biomembranen, die Pflanzenwachstumsrate, der pH-Wert der Pflanzenkompartimente und der Transpirationssog als Faktoren gelten, die die Aufnahme und Verteilung von organischen Kontaminanten in Pflanzen bestimmen (Fantke et al., 2016; Zhang et al., 2017).

Für die Pflanzenaufnahme über das Wurzelsystem stehen zum einen die im Porenwasser des Bodens gelösten Antibiotika zur Verfügung, die mit dem Transpirationswasser aufgenommen werden können (Ciffroy et al., 2018; Hu et al., 2010b; Miller et al., 2016). Dies sind wie bereits

im vorangestellten Kapitel ausführlich beschrieben insbesondere Substanzen mit geringer Sorptionsneigung an die organische Bodensubstanz und Bodenmineralien. Hieraus resultiert eine gute Bioverfügbarkeit im Bodenporenwasser (vgl. **Kapitel 1.6**). Eine weitere Aufnahme kann durch die Adsorption von Bodenpartikeln an die Wurzeloberfläche erfolgen, indem Austauschprozesse (Diffusion) ins Pflanzengewebe stattfinden (Trapp and Legind, 2011). Eine Aufnahme über den Luftpfad in die Blätter spielt offenbar lediglich für flüchtige Verbindungen eine Rolle und ist daher für die Antibiotikaaufnahme nicht relevant (Thiele-Bruhn, 2003).

Allgemein wird in älterer Literatur angenommen, dass neutrale, nicht-ionisierbare, lipophile Substanzen deutlich besser über Pflanzenwurzeln aufgenommen werden, als geladene und polare Substanzen (Boxall et al., 2006). Dies wird mit einer besseren Passage der lipophilen Biomembranen (z.B. Plasmamembran) in Verbindung gebracht (Briggs et al., 1982; Goldstein et al., 2014; Trapp, 2000). In aktuelleren Artikeln aus dem Jahr 2018 wurde herausgestellt, dass keine allgemein gültige Abhängigkeit zwischen der Lipophilie und dem Aufnahmeverhalten eines Wirkstoffes in Pflanzen besteht. Insbesondere bei ionischen Substanzen ist deren Dissoziationsverhalten und folglich der Ladungszustand, bedingt durch den umgebenden Boden pH-Wert und den pH-Wert des Pflanzenkompartimentes, für die Aufnahme und Verteilung in Pflanzen bedeutend (Doucette et al., 2018).

Beurteilungsgrundlagen für die Verteilung und Anreicherung von Schadstoffen in Pflanzen

In der Literatur existieren bereits mehrere mathematische Modelle, über welche der Transfer von Schadstoffen in Pflanzen und deren Verteilung in einzelne Pflanzenkompartimente quantifiziert und abgeschätzt wird (Briggs et al., 1982; Dettenmaier et al., 2009; Travis and Arms, 1988). Faktoren, die für die Beschreibung des Aufnahmeverhaltens von Chemikalien in Pflanzen herangezogen werden, beziehen sich auf das Verhältnis der Chemikalienkonzentration in dem jeweiligen Pflanzenkompartiment (z.B. Blätter, Stängel, Wurzeln, Xylemsaft) zu dem umgebenden Expositionsmedium (z.B. Boden, Bodenporenwasser, Hydrokulturlösung, Luft). Diese werden als Biokonzentrationsfaktoren (BCF) zusammengefasst und je nach dem betrachteten Pflanzenkompartiment spezifiziert (z.B. Wurzelkonzentrationsfaktor (RCF), Blattkonzentrationsfaktor (LCF), Transpirationsstromkonzentrationsfaktor (TSCF)) (**Gl. 1-4, Abbildung 1-5**) (Doucette et al., 2018). Der BCF gilt nur für das betrachtete Antibiotikum und den Pflanzen- und Bodentyp, der für die Bestimmung verwendet wurde (Trapp and Legind, 2011).

$$\text{BCF} = \frac{C_{\text{Pflanzenkompartiment}}}{C_{\text{Boden}}} \quad (\text{Gl. 1-4})$$

mit:

C_{Pflanze} Antibiotikakonzentration im Pflanzenkompartiment [$\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$]

C_{Boden} Antibiotikakonzentration im Boden (meist nach der Ernte der Pflanzen) [$\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$]

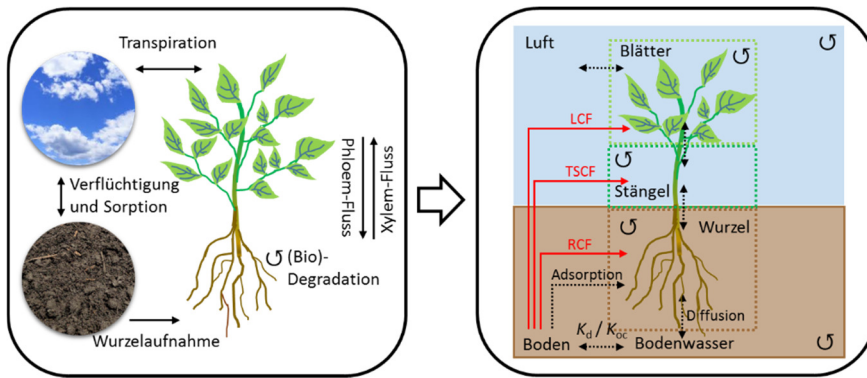


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen von Pflanzen mit der Umwelt und von Prozessen, die in der Pflanze zu einer Anreicherung bzw. Abnahme der Wirkstoffkonzentrationen führen. Modifiziert nach (Fantke et al., 2016).

Häufig werden die BCF lediglich über die Lipophilie des betrachteten Schadstoffes unter Einbeziehung des K_{ow} -Wertes der Substanz abgeschätzt (Doucette et al., 2018). In einem kürzlich veröffentlichten Reviewartikel wurden Literaturdaten, welche in den Jahren 1955 – 2014 zu Chemikalienrückständen in Pflanzen veröffentlicht wurden, auf eine Abhängigkeit zwischen dem K_{ow} -Wert der Substanz und seiner Pflanzenbioakkumulation zusammengetragen und auf der Grundlage bereits bestehender Modelle bewertet (Doucette et al., 2018). Doucette et al. stellten die Biokonzentrationsfaktoren auf Grundlage von 95 publizierten Artikeln zusammen und erhielten so 1.975 Datensätze, welche eine Chemikalienaufnahme aus Böden in die Pflanzen beschrieben. Den Daten wurde gemäß ihrer Qualität eine niedrige, mittlere oder hohe Bedeutung zugeteilt. Sie sind in **Abbildung 1-6** aufgeführt (links: neutrale Substanzen, rechts: ionisierbare Substanzen). Wie aus den Daten ersichtlich, variieren die BCF-Werte für Chemikalien mit gleichen oder ähnlichen $\log K_{ow}$ -Werten stark (Faktor 100) und lassen keinen allgemein gültigen Zusammenhang zwischen der Aufnahme und dem K_{ow} -Wert zu. Ein weit verbreitetes Modell von Travis und Arms postulierte eine Abnahme des Aufnahmeverhaltens von Schadstoffen aus dem Boden in die Pflanze mit zunehmender Lipophilie (Travis and Arms, 1988). Nach der umfangreichen Literaturstudie konnte das Modell nach Travis und Arms nicht bestätigt werden, wie aus der Verteilung der Datenpunkte ersichtlich ist. Bei der Anwendung des Modells zur Risikoabschätzung würden die Konzentrationen von Substanzen mit einem $\log K_{ow}$ -Wert > 5 unterschätzt werden (Doucette et al., 2018).

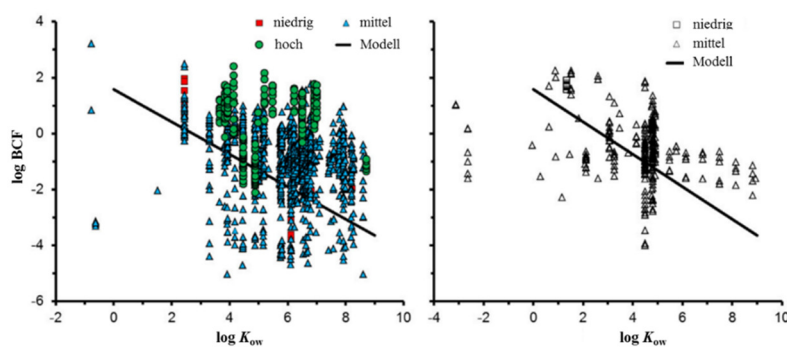


Abbildung 1-6: Biokonzentrationsfaktoren verschiedener Pflanzenkompartimente, welche gegenüber Schadstoffexpositionen aus Böden bestimmt wurden, in Abhängigkeit des $\log K_{ow}$ -Wertes. Links: neutrale Substanzen; rechts: ionisierbare Substanzen. Grafik entnommen aus (Doucette et al., 2018). Modell nach (Travis and Arms, 1988).

Abschließend wurde anhand der umfangreichen Literaturstudie gezeigt, dass die Aufnahme und Verteilung von Antibiotika in Pflanzen von vielen Faktoren abhängt, die nicht in den Modellen berücksichtigt werden. Die weit verbreitete und häufig zitierte Meinung, dass eine Korrelation zwischen der Lipophilie einer Substanz und dessen Pflanzenaufnahme besteht, konnte nicht als allgemeingültig herausgestellt werden. Versuche mit neutralen Substanzen zeigten bereits Abweichungen zu den postulierten Modellen. Die Komplexität der Modellfindung wird durch ionische Spezies zusätzlich erschwert und bisher sind keine zufriedenstellenden Modelle vorhanden. Die pH-Werte der Expositionsmedien sind nicht berücksichtigt, die Pflanzenwachstumsraten und die Veränderung der chemischen Konzentrationen in den Expositionsmedien am Ende der Expositionszeit werden meist nicht dokumentiert. Die Bodeneigenschaften spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle, da sie die Bioverfügbarkeit der Substanzen wesentlich bestimmen (**Kapitel 1.6**). Diese werden häufig nicht mit einbezogen. Zudem werden mögliche Abbau- und Transformationsprozesse in der Pflanze nicht in Betracht gezogen. So lange keine zuverlässigen Modelle existieren, ist eine experimentelle Bestimmung der Antibiotikagehalte in den Pflanzen aufgrund der Pflanzenunterschiede, Umweltbedingungen und Wirkstoffeigenschaften für eine Risikoabschätzung unabdingbar.

1.7.3 Besonderheiten bei der Pflanzenaufnahme ionisierbarer Stoffe

Für ionisierbare Substanzen, die abhängig von dem pH-Wert des Expositionsmediums (Boden, Bodenporenwasser, Hydrokulturlösung), als auch des Pflanzenkompartimentes dissoziiert vorliegen können, kann der K_{ow} -Wert nicht als geeigneter Parameter für die Vorhersage des Aufnahmeverhaltens in Pflanzen herangezogen werden (Goldstein et al., 2014). Auch die Ladungen der Zellmembranen spielen eine entscheidende Rolle für die Aufnahme und Verteilung der Wirkstoffe. Wie bereits in **Kapitel 1.6** herausgestellt, sind bei ionischen Substanzen neben hydrophoben und kovalenten Wechselwirkungen auch elektrostatische Wechselwirkungen an der Wirkstoff-Boden-Interaktion beteiligt. Die lediglich auf Lipophilie basierenden Modelle sind daher nicht anwendbar. Laut Trapp und Legind haben neutrale und ionische Moleküle verschiedene physikalisch-chemische Eigenschaften die deren Aufnahme in die Pflanzen beeinflussen (Trapp and Legind, 2011). Im Vergleich zu der neutralen Form, ist die ionische Form polarer und wasserlöslicher. Durch diese Eigenschaften wäre theoretisch ein hohes Akkumulationspotential in der Pflanze möglich.

Sulfonamide und Tetracycline gelten als ionisierbare Substanzen, welche abhängig von dem umgebenden pH-Wert in kationischer, anionischer, neutraler oder zwitterionischer Form vorliegen. Kationen wird generell eine starke Adsorptionsneigung an der organischen Bodensubstanz (SOM) und an Tonmineralien zugeschrieben (Franco and Trapp, 2008; Trapp and Legind, 2011). Als Konsequenz daraus ist deren Bioverfügbarkeit im Bodenporenwasser herabgesetzt. Anionische Spezies binden hingegen nicht an die negativ geladenen Bodenbestandteile und wären prinzipiell für eine Pflanzenaufnahme im Bodenporenwasser verfügbar. Trapp stellte jedoch heraus, dass geladene Antibiotikamoleküle nur sehr langsam die Biomembranen (z.B. Plasmamembran) passieren können (Trapp, 2004), wodurch deren Aufnahme in die Pflanze

limitiert ist. Am Beispiel des Sulfamethazins kann das Aufnahmeverhalten in Pflanzen wie folgt beschrieben werden (**Abbildung 1-7**, **Abbildung 1-8**):

Mit abnehmendem pH-Wert des Expositionsmediums (pH 4 – 6) steigt die Aufnahme von Sulfamethazin aufgrund des Vorliegens der undissoziierten Form an. Diese kann Zellmembranen besser durchqueren als die geladene Form. Aufgrund des höheren pH-Wertes im Cytoplasma (7 – 7,5) dissoziiert die Substanz dort und es entsteht neben der neutralen Form die anionische Spezies. Da die Membranpermeabilität der Anionen aufgrund der repulsiven Wechselwirkung sehr gering ist (Devillers, 2009) kommt es zu einer Akkumulation der anionischen Form in Bereichen mit einem höheren pH-Wert wie z.B. im Cytoplasma und Phloem (pH 8). Der Mechanismus der für die Anreicherung ionischer Antibiotikamoleküle in der Pflanze verantwortlich sein kann, ist der sogenannte Ionenfalleneffekt („ion-trapping“) (Goldstein et al., 2014; Trapp, 2004). Die neutrale Form kann interzellulär weiter zu dem Xylem gelangen. Im Xylem herrscht ein pH-Wert von 5,5 vor. Dort wird der Wirkstoff größtenteils in seiner neutralen Form vorliegen und eine Translokalisierung in andere Pflanzenteile (Blätter und Früchte) ist über den Xylemsaft denkbar.

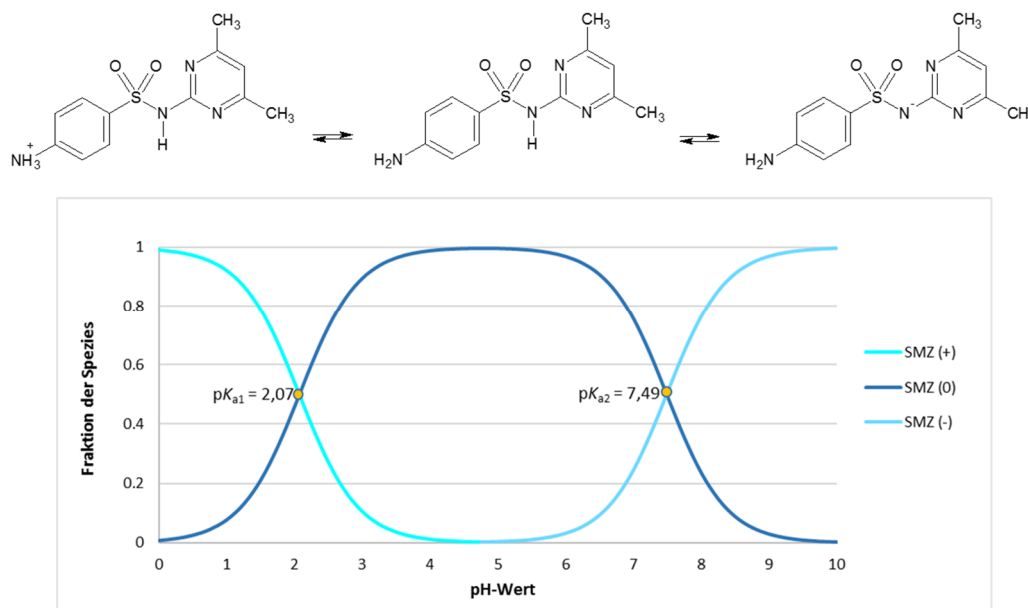


Abbildung 1-7: Dissoziationskurve von Sulfamethazin in Abhängigkeit des pH-Wertes.

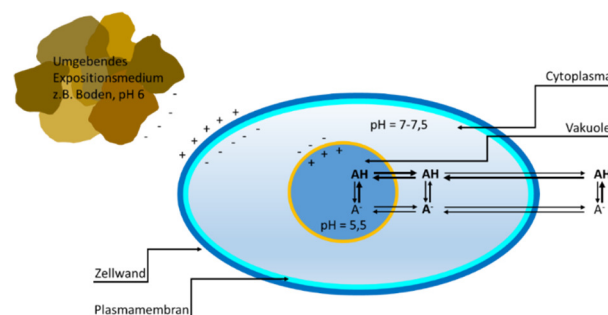


Abbildung 1-8: Dissoziationsverhalten von Antibiotika in Pflanzenzellen. Modifiziert nach (Trapp, 2004).

1.8 Wirkstoffgruppe der Tetracycline

Tetracycline werden aus *Streptomyces*-Arten isoliert und gegebenenfalls zur Erweiterung des Wirkspektrums sowie zur Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften synthetisch modifiziert. Der erste Wirkstoff aus der Gruppe der Tetracycline, das Chlortetracyclin, wurde im Jahr 1948 von dem Botaniker Benjamin Minge Duggar entdeckt. Es wurde aus dem Kulturfiltrat von *Streptomyces aureofaciens* isoliert (Duggar, 1948; Dürckheimer, 1975; Muxfeldt, 1962). Im Jahre 1963 wurde Doxycyclin von C. R. Stephens entdeckt. Dieser Wirkstoff wurde durch chemische Modifikation aus Oxytetracyclin entwickelt und besitzt, bedingt durch die höhere Lipophilie, verbesserte pharmakologische Eigenschaften im Vergleich zu anderen Tetracyclinen (Aronson, 1980). Für die vorliegende Arbeit sind insbesondere Chlortetracyclin und Doxycyclin von Interesse. Diese werden derzeit noch häufig in hohen Mengen u. a. in der Schweine- und Geflügelmast eingesetzt (Sattelberger et al., 2005). Darüber hinaus werden in einigen nicht-europäischen Ländern, wie beispielsweise den Vereinigten Staaten, Tetracycline in subtherapeutischen Dosierungen dem Tierfutter zugefügt, um als Wachstumsförderer zu wirken (Sarmah et al., 2006). Deren Persistenz in der Umwelt wurde schon früh belegt und gibt Anlass zu weiteren Untersuchungen (Hamscher et al., 2002; Hamscher et al., 2000; Höper et al., 2003; Pawelzick et al., 2004).

1.8.1 Wirkmechanismus

Tetracycline sind bakteriostatisch wirkende Antibiotika. Aufgrund ihres breiten Wirkungsspektrums gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien⁶, sowie ihres geringen Preises, werden Tetracycline häufig in der Human- und Veterinärmedizin zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten der Atemwege, des Magen-Darm-Traktes, der Augen und der Haut angewandt (Anderson et al., 2005; Chopra and Roberts, 2001; Löscher and Richter, 2016). Sie zeigen eine hohe Wirkung gegenüber *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella schottmulleri*, *Escherichia coli* und *Mycrobacterium tuberculosis* (Sithole and Guy, 1987). Ihr Wirkmechanismus beruht auf der Hemmung der bakteriellen Proteinbiosynthese, indem sie die Anlagerung der Aminoacyl-tRNAs an die ribosomale 30S-Untereinheit blockieren (Dürckheimer, 1975; Steinhilber et al., 2005).

1.8.2 Physikalische und chemische Eigenschaften

Die Wirkstoffgruppe der Tetracycline leitet sich von einem partiell hydrierten und oxidierten Naphthacen-Grundgerüst (vier linear kondensierte Cyclohexanringe) ab (**Abbildung 1-9**) (Dürckheimer, 1975; Höck and Ziesing, 2016). Die einzelnen Tetracycline unterscheiden sich durch die Substituenten an C₅, C₆ und C₇. Einige Vertreter sind in **Tabelle 1-3** zusammengestellt. Tetracycline sind kristalline, gelb bis braun gefärbte Substanzen. Sie weisen einen amphoteren Charakter auf und neigen zur Komplexbildung mit mehrwertigen Kationen.

⁶Bei den Bakterien wird in Abhängigkeit des Zellwandaufbaus zwischen gramnegativen und grampositiven Vertretern unterschieden. Die Zellwand der grampositiven Bakterien, welche keine äußere Membran besitzen, besteht aus einer dicken Peptidoglycan-Schicht (Mureinschicht). Im Gegensatz dazu verfügen gramnegative Bakterien über eine äußere Membran, weisen jedoch lediglich eine dünne Peptidoglycan-Schicht auf. Weitere Unterschiede sind der aufgeführten Literatur zu entnehmen (Keweloh, 2008).

Sie besitzen zudem eine hohe Affinität zu Silanolgruppen (Oka et al., 2000).

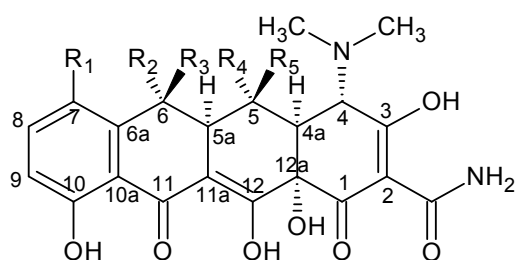


Abbildung 1-9: Grundstruktur der Wirkstoffgruppe der Tetracycline.

Tabelle 1-3: Verschiedene Vertreter aus der Wirkstoffgruppe der Tetracycline.

Wirkstoff	Molekulargewicht	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Tetracyclin	480,91 g mol ⁻¹	-H	-CH ₃	-OH	-H	-H
Oxytetracyclin	460,44 g mol ⁻¹	-H	-CH ₃	-OH	-OH	-H
Chlortetracyclin	478,86 g mol ⁻¹	-Cl	-CH ₃	-OH	-H	-H
Doxycyclin	444,43 g mol ⁻¹	-H	-CH ₃	-H	-OH	-H
Demeclocyclin	464,85 g mol ⁻¹	-Cl	-H	-OH	-H	-H

1.8.3 Bildung von Transformationsprodukten

Tetracycline können in Lösung abhängig von der Temperatur und dem pH-Wert Transformations- und Abbaureaktionen unterliegen. Im Folgenden werden am Beispiel des Chlortetracyclins die Konfigurationsänderungen durch Epimerisierung und Isomerisierung⁷ (Abbildung 1-10) aufgezeigt. Die antibakterielle Wirkung des Epimers wird als gering eingestuft (etwa 5 % der Wirkung der Ausgangsverbindung), während der Isoform eine sehr geringe Wirkung gegenüber Antibiotika zugesprochen wird (< 1 % der Wirkung der Ausgangsverbindung) (Halling-Sørensen et al., 2002; Rogalski, 1985). In saurer Lösung (pH 2 – 6) unterliegen Tetracycline einer Epimerisierung an der Dimethylaminogruppe des C₄-Atoms (Stephens et al., 1956). Die Epimerisierung ist reversibel. Über die Rückepimerisierung kann ggf. wieder die volle Wirkung entfaltet werden. Die Isomerisierung erfolgt im Alkalischen bei pH-Werten über 7 und ist irreversibel (Arikan, 2008; Bruice, 2007; Cessna et al., 2011).

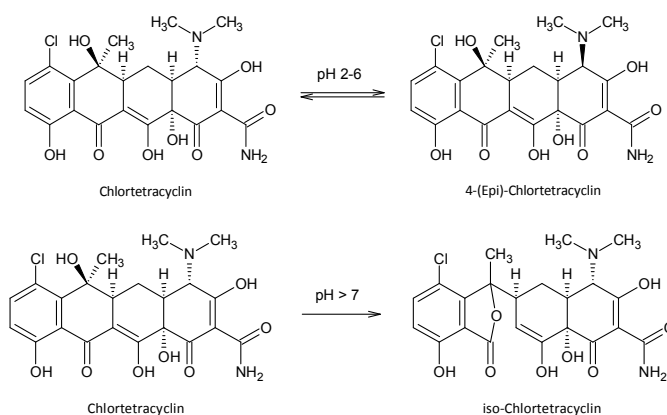


Abbildung 1-10: Epimerisierung und Isomerisierung von Chlortetracyclin.

⁷Epimere: „Diastereomere, die sich nur in der absoluten Konfiguration an einem von mehreren vorhandenen Chiralitätszentren unterscheiden“. Isomere: „chemische Verbindungen, welche die gleiche Summenformel besitzen, sich aber in der Verknüpfung (Konstitutionsisomere) und räumlichen Anordnung (Stereoisomere) der einzelnen Atome unterscheiden“ (Bruice, 2007).

1.9 Wirkstoffgruppe der Sulfonamide

Sulfonamide werden synthetisch hergestellt und zählen zu den ersten erfolgreich eingesetzten Antibiotika (Choquet-Kastylevsky et al., 2002). Der erste Vertreter aus dieser Wirkstoffgruppe ist das Sulfamidochrysoidin. Dessen antibakterielle Wirksamkeit wurde im Jahr 1935 von Gerhard Domagk entdeckt, welcher vier Jahre später hierfür mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurde (Domagk, 1935; Grundmann, 2001). In der vorliegenden Arbeit wird das Umweltverhalten der beiden Wirkstoffe Sulfamethazin und Sulfamethoxazol näher betrachtet. Sulfamethazin wird seit 2003 ausschließlich in der Veterinärmedizin (Schweine-, Hühner-, Putenmast) zur Behandlung bakterieller Infektionen angewendet, während Sulfamethoxazol neben der Verwendung im Veterinärmedizinbereich (11 %) hauptsächlich in der Humanmedizin (89 %) zum Einsatz kommt (Hannappel et al., 2016; Mohring et al., 2009).

1.9.1 Wirkmechanismus

Sulfonamide wirken – wie die Tetracycline – bakteriostatisch gegen grampositive und gramnegative Bakterien (Accinelli et al., 2007). Ihr Wirkmechanismus beruht auf der Hemmung des Folsäurestoffwechsels. Sie fungieren als kompetitive Antagonisten der *p*-Aminobenzoessäure, die bei der bakteriellen Dihydrofolsäure-Synthese mit Hydroxymethyl-dihydropterin zur Dihydropteroinsäure verknüpft wird. Sulfonamide werden häufig als Kombinationspräparate verabreicht. Sulfamethoxazol wird beispielsweise in Verbindung mit Trimethoprim verwendet. Die Kombination im Verhältnis 5:1 wird als Cotrimoxazol bezeichnet und besitzt eine bakterizide Wirkung (Fille and Ziesing, 2016; Steinhilber et al., 2005).

1.9.2 Physikalische und chemische Eigenschaften

Das charakteristische Strukturelement der Sulfonamide ist ein Benzolring mit einer Sulfonsäureamid-Funktion (SO₂-NH₂) und einer Aminogruppe (NH₂) in *para*-Stellung (**Abbildung 1-11**). Die einzelnen Vertreter unterscheiden sich hinsichtlich der Substitution am Amid-Stickstoff (**Tabelle 1-4**). Bei den Substituenten handelt es sich häufig um Stickstoffheterocyclen (Choquet-Kastylevsky et al., 2002). Der Substituent bestimmt maßgeblich die renale Eliminationsgeschwindigkeit und damit verbunden die Halbwertszeit im Organismus. Die *para*-Aminofunktion ist hingegen für deren antibakterielle Wirkung ausschlaggebend und die Einführung von Substituenten an dieser hat einen vollständigen Wirkungsverlust zur Folge (Steinhilber et al., 2005; Zessel et al., 2014).

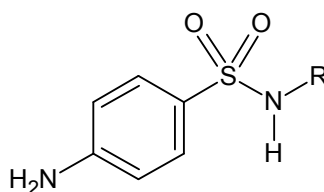
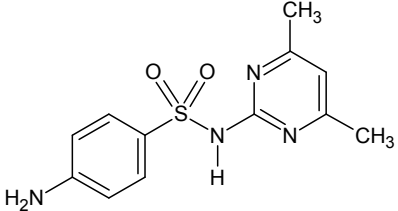
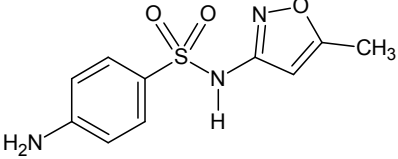
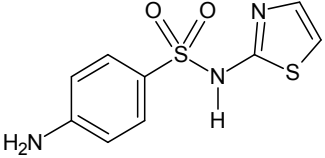
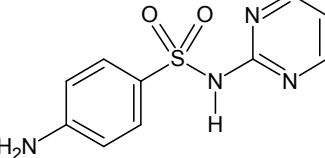


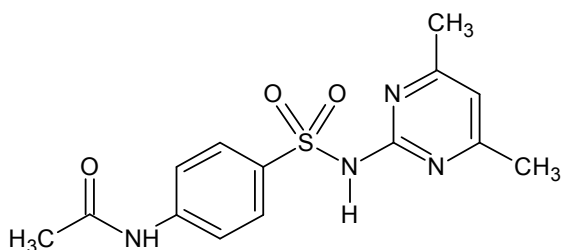
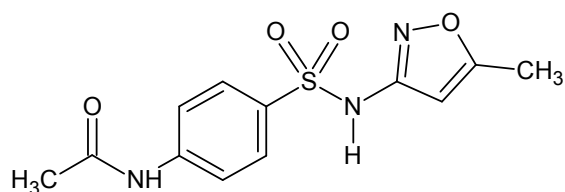
Abbildung 1-11: Grundstruktur der Wirkstoffgruppe der Sulfonamide.

Tabelle 1-4: Verschiedene Vertreter aus der Wirkstoffgruppe der Sulfonamide.

Wirkstoff	Molekulargewicht	Strukturformel
Sulfamethazin	278,3 g mol ⁻¹	
Sulfamethoxazol	253,3 g mol ⁻¹	
Sulfathiazol	255,3 g mol ⁻¹	
Sulfadiazin	250,3 g mol ⁻¹	

1.9.3 Bildung von Metaboliten

Der Hauptmetabolit der Sulfonamide, welcher im tierischen Organismus gebildet wird, ist das *N*-Acetyl-Derivat (**Abbildung 1-12**, **Abbildung 1-13**). Die Acetylierung erfolgt an der Aminogruppe und führt zu der Inaktivierung der antibakteriellen Wirksamkeit. Einige Studien berichten allerdings von Deacetylierungsprozessen im Laufe der Güllelagerung, bedingt durch Mikroorganismen und einhergehend damit, Rückumwandlung in die antibiotisch aktiven Ausgangssubstanzen (Heuer et al., 2011). Neben dem genannten Hauptabbauweg kann auch eine Glucuronidierung an der Aminogruppe stattfinden. Am Amidstickstoff kann ebenfalls eine Glucuronidierung sowie Hydroxylierung erfolgen (Forth, 2001).

**Abbildung 1-12:** *N*-Acetyl-Sulfamethazin.**Abbildung 1-13:** *N*-Acetyl-Sulfamethoxazol.

1.10 Analytik

Die Herausforderungen an die analytische Bestimmung von Antibiotikarückständen in komplexen Umweltmatrices, wie Gülle, Pflanzen, Sickerwasser und Boden, sind hoch. Der Einsatz selektiver und sensitiver Nachweisverfahren ist daher für die Quantifizierung im Spurenbereich unabdingbar. Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit der Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) stellt ein solches Verfahren dar. Um eine Messung mittels LC-MS/MS vornehmen zu können, müssen die Zielanalyten zunächst in einer flüssigen Phase vorliegen. Dem chromatographischen Verfahren wird bei feststoffreichen Umweltproben meist ein Fest-Flüssig-Extraktionsverfahren vorangestellt um die Zielanalyten möglichst quantitativ aus der Probenmatrix herauszulösen und in eine flüssige Phase zu überführen. Für die Antibiotikaanalytik haben sich hierzu insbesondere Kombinationen aus organischen Lösungsmitteln und Phosphat-Citrat-Puffer mit EDTA-Zusatz als effiziente Extraktionsmittel erwiesen (Berenzen et al., 2015; Oka et al., 2000). Im Anschluss daran folgt häufig eine Anreicherung der Analyten verbunden mit der Aufreinigung des Probenextraktes über Festphasenextraktion (SPE: **S**olid **P**hase **E**xtraction) als weiterer Probenvorbereitungsschritt. Dies trägt zur Minimierung von Matrixeffekten sowie zur Erzielung niedriger Bestimmungsgrenzen in der nachgeschalteten LC-MS/MS-Analytik bei. Mittels SPE wird die flüssige Probe über ein zuvor konditioniertes und äquilibriertes Sorbentmaterial gegeben. Für die Analytik von Tetracyclinen und Sulfonamiden haben sich modifizierte Umkehrphasen als geeignetes Sorbentmaterial der SPE-Kartuschen gezeigt (Azanu et al., 2016). Die im Probenextrakt enthaltenen Analyte adsorbieren im Idealfall vollständig an dem Sorbens. Durch geeignete Waschschrte können störende Matrixbestandteile entfernt werden. Die Elution der Analyte von der festen Phase erfolgt meist mittels organischer Lösungsmittel (i.d.R. Methanol, Acetonitril). Im Anschluss an die SPE kann das Eluat direkt in das LC-System injiziert werden oder durch Einengen mittels Stickstoffstrom weiter angereichert bzw. umgelöst werden. Meist erfolgt die Wiederaufnahme der Analyte nach dem Eindampfen in dem Eluenten der LC.

Im Folgenden wird das Prinzip der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit der Tandem-Massenspektrometrie näher beschrieben. Das UHPLC-MS/MS-System, welches in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, besteht im Wesentlichen aus vier Bauelementen: Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatograph, Ionisierungsquelle, Massenanalysator und Detektor.

1.10.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Zurückzuführen sind chromatographische Verfahren auf den russischen Botaniker Michail Semjonowitsch Tswett. Er führte im Jahr 1903 einen Versuch durch, bei dem er einen Pflanzenextrakt über eine mit feinverteiltem Calciumcarbonat gefüllte Glassäule in die einzelnen Farbstoffkomponenten trennte. Durch die Trennung nach Farben leitete Tswett den Namen der Chromatographie ab (griechisch *chroma*: die Farbe; *graphein*: schreiben) (Otto, 2006). Dieses

Prinzip der Auftrennung einzelner Substanzen eines Stoffgemisches zwischen einer stationären und einer mobilen Phase wird bis heute auch in modernen flüssigkeitschromatographischen Verfahren wie der UHPLC (**Ultra High Performance Liquid Chromatography**) verwendet. Die UHPLC ist eine Weiterentwicklung der HPLC und ermöglicht Substanztrennungen in kürzerer Zeit. Im Vergleich zur HPLC werden wesentlich dünnere und kürzere Säulen verwendet. Der Partikeldurchmesser des Füllmaterials der Säule liegt bei 2 μm und weniger. Durch die damit verbundene deutliche Vergrößerung der Oberfläche des Füllmaterials im Vergleich zu 5 bzw. 10 μm Materialien wird eine bessere Trennleistung der Säule erreicht. Allerdings ist eine Druckerhöhung die Folge, daher müssen UHPLC-Geräte Drücke bis zu 1000 bar realisieren können (Guillarme et al., 2010; Le Bizec et al., 2009). Ein Vorteil der UHPLC ist die Verringerung der Analysezeit und der damit verbundenen Lösungsmittelmenge. Insbesondere für Routinelabore wie dem LHL, sind möglichst hohe Probendurchsätze in kürzester Zeit und der Einsatz geringer Lösungsmittelmengen erstrebenswert und von wirtschaftlicher Bedeutung.

Bei der Flüssigchromatographie wird eine mobile Phase (Eluent) gemeinsam mit den Analytmolekülen der Probenlösung unter Anlegen eines Druckes über eine Trennsäule geführt. In der Säule befindet sich eine stationäre Phase. Als Material der stationären Phase wird meist modifiziertes Kieselgel verwendet. Das Trennprinzip der Flüssigkeitschromatographie beruht im Wesentlichen auf Verteilungs- und Adsorptions- / Desorptionsmechanismen zwischen den Analytmolekülen der Probe und der stationären und mobilen Phase aufgrund unterschiedlicher Polaritäten (Cammann, 2001). Je stärker die Analytmoleküle mit der stationären Phase in Wechselwirkung treten und retardiert werden, desto später eluieren sie von der Säule. Im Idealfall werden die Einzelkomponenten des Probengemisches vollständig getrennt. Um die Trennleistung zu steigern, können z.B. unterschiedliche stationäre Phasen, Eluenten, Fließgeschwindigkeiten der mobilen Phase, Gradienten und Säulentemperaturen eingesetzt werden. Im Betrieb injiziert das UHPLC Gerät zunächst eine kleine Menge einer Probelösung über ein Ventil in den Lösungsmittelfluss, der die Analysenlösung dann zur Säule transportiert. Nach chromatographischer Auftrennung in der Säule, findet die Detektion der einzelnen Komponenten über ein Tandem-Massenspektrometer statt. Dieses besteht aus einem Einlasssystem, einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor (**Abbildung 1-14**). Die einzelnen Schritte bis zur Detektion werden nun für das in dieser Arbeit verwendete Gerät erläutert.

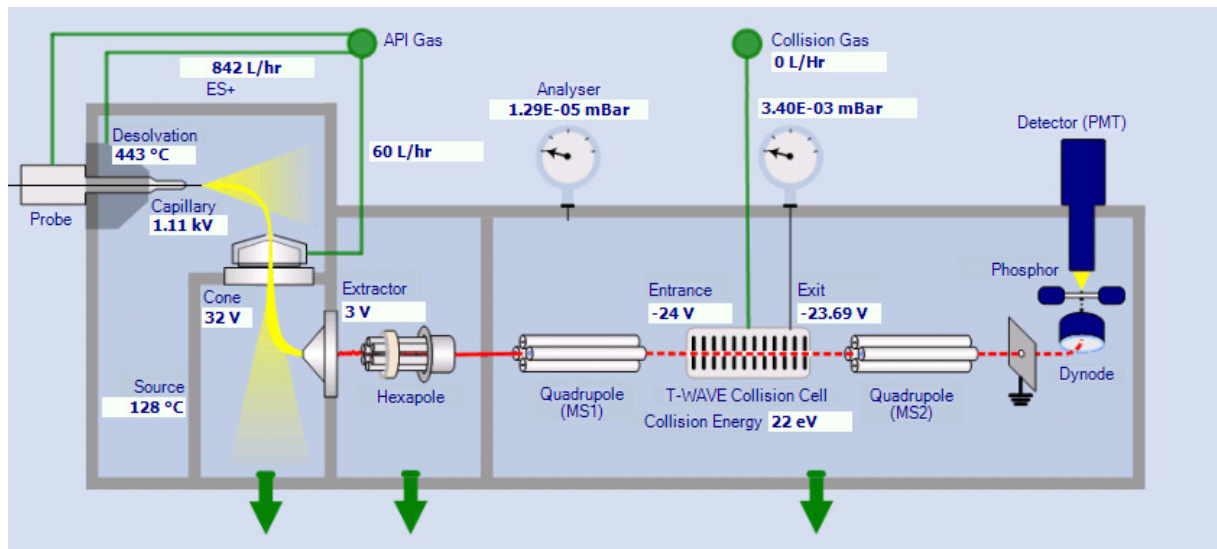


Abbildung 1-14: Schematischer Aufbau eines Tandem-Massenspektrometers der Firma Waters mit Einlasssystem, Ionenquelle, Massenanalysator und Detektionseinheit. Abbildung entnommen aus der Waters Software MassLynx 4.1.

Im Allgemeinen erfolgt bei der Massenspektrometrie die Ionisierung der Analyte in einer Ionenquelle durch Anlegen einer Spannung und anschließender Trennung der gebildeten Ionen im Massenanalysator gemäß ihrem Masse- zu Ladungsverhältnis.

1.10.1.1 Das Elektrospray-MS-Interface (Ionenquelle)

In der Ionenquelle (**Abbildung 1-15**) findet die Ionisation der Analyten statt. Die Erzeugung der Ionen erfolgt für die Antibiotika-Analytik über Elektrosprayionisation (ESI) unter Atmosphärendruck im positiven Modus. Die mobile Phase wird gemeinsam mit dem Analytgemisch durch eine feine Kapillare geleitet, welche gegenüber der Gegenelektrode eine positive Spannung von 1 bis 2 kV aufweist. An der Spitze der Nadel bildet sich ein Taylor-Kegel, der ein Kräftegleichgewicht zwischen Gravitation, Oberflächenspannung, innerem / äußerem hydrostatischen Druck und dem elektrischen Feld darstellt. Beim Überschreiten einer bestimmten elektrischen Feldstärke bildet sich aus dem Kegel ein feiner Strahl (Jet), der sofort in gleichgeladene Tröpfchen zerfällt. Durch Verwendung eines heißen Inertgasstroms (Stickstoff) wird erreicht, dass im geladenen Aerosol das Lösungsmittel verdampft. Es entstehen hauptsächlich einfach geladene Pseudomolekülonen der Form $[M+H]^+$. Durch die Off-Axis-Anordnung der Elektroden werden Verunreinigungen durch Ablagerungen ungeladener Moleküle weitgehend vermieden. Ein weiterer Vorteil dieser Anordnung besteht darin, dass lediglich kleine hochgeladene Tröpfchen die Öffnung der Cone durchdringen können. Dadurch kommt es selektiv zu einer Anreicherung der Analyt-Ionen.

Der Ionenstrahl wird anschließend durch eine Transferoptik, bestehend aus einem Hexapole, fokussiert und gebündelt in das Hochvakuum des Tandem-Quadrupolmassenspektrometers überführt (Gross, 2013).

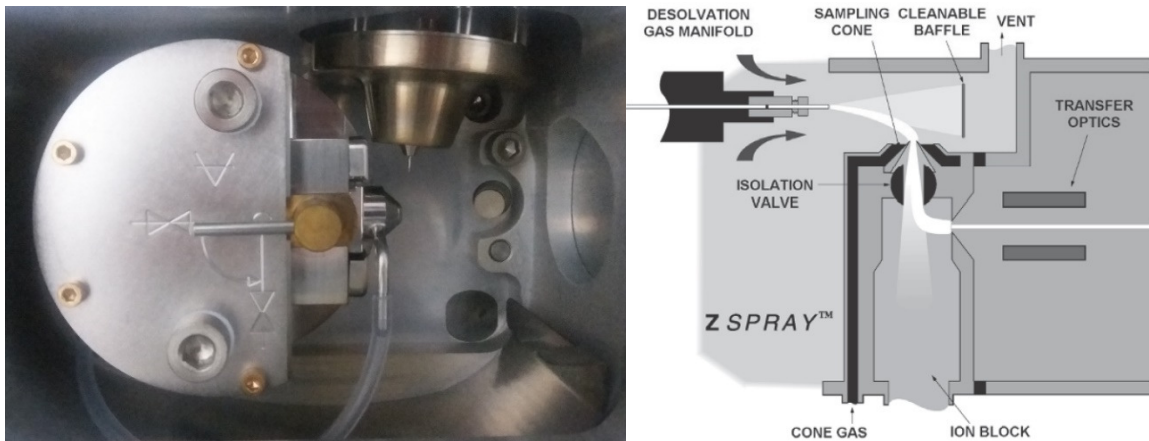


Abbildung 1-15: Aufbau der Ionenquelle und schematische Funktionsweise der Elektrosprayionisation (ESI). Rechte Abbildung entnommen aus (Gross, 2013).

1.10.1.2 Tandem-Massenspektrometer (Massenanalysator)

Ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer besteht aus zwei Quadrupol Massenfiltern (MS1 und MS2) mit zwischengeschalteter Kollisionszelle (**Abbildung 1-14**). Der lineare Quadrupol Massenanalysator setzt sich aus vier zylinderförmigen Metallstäben, die in einem Quadrat zueinander angeordnet sind und als Elektroden fungieren zusammen (**Abbildung 1-16**). Dabei besitzen je zwei sich gegenüberliegende Elektrodenpaare das gleiche elektrische Potential (+ oder -). An die Stabpaare wird eine konstante Gleichspannung U angelegt auf die eine Wechselspannung mit der Amplitude V und der Frequenz $f = \omega/2\pi$ überlagert wird:

$$U_{\text{QMS}} = U + V \cdot \cos(\omega t) \quad (\text{Gl. 1-5})$$

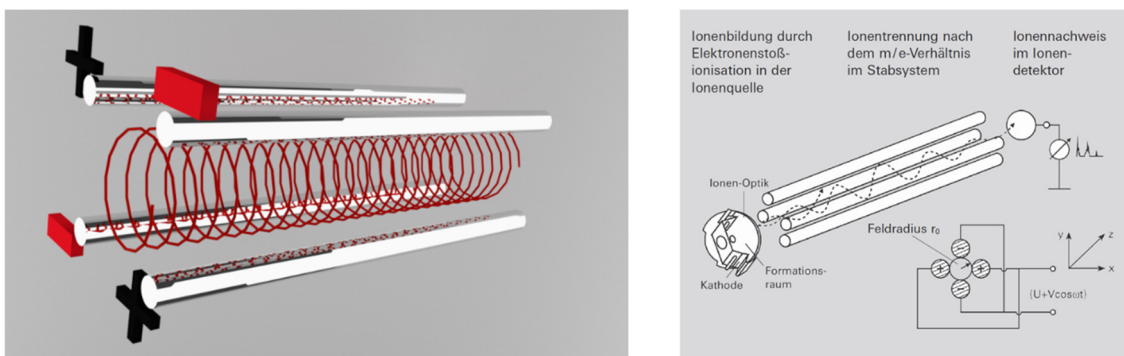


Abbildung 1-16: Schematische Darstellung eines Quadrupol-Massenspektrometers. Rechte Abbildung entnommen aus (Pfeiffer, 2017).

Treten nun Ionen mit gleicher kinetischer Energie in das Quadrupolfeld ein, so werden diese durch das elektrische Wechselfeld in x- und y-Richtung abgelenkt. Die Ionen werden auf eine sinusförmige Bahn um die z-Achse gezwungen. Die Gesamtgeschwindigkeit der Ionen ist hier-

bei abhängig von der Masse. Ionen höherer Masse können aufgrund ihrer Trägheit den Richtungswechsel bedingt durch die Spannungsänderungen nur langsam vornehmen und werden weniger stark aus der Flugbahn abgelenkt als leichtere Ionen. Insofern der Radius dieser Sinusbewegung kleiner als der Feldradius des Quadrupol-Massenspektrometers ist, können die Ionen transmittieren. Ist der Radius jedoch größer, so kommt es zur Kollision mit den Elektroden und die Ionen werden entladen und können nicht passieren. Stabile Flugbahnen der Ionen (Trajektorien) können mittels Aufstellung von Bewegungsgleichungen und Lösen der Mathieuschen Differentialgleichungen berechnet werden. Da durch die ESI hauptsächlich geladene unfragmentierte Ionen entstehen ist nach dem ersten Quadrupol eine Stoßionisation nötig um die Moleküle signifikant durch deren Fragmente zu identifizieren (*collision-induced dissociation*). Dies gelingt mit einer Kollisionszelle wie sie in **Abbildung 1-17** dargestellt ist.

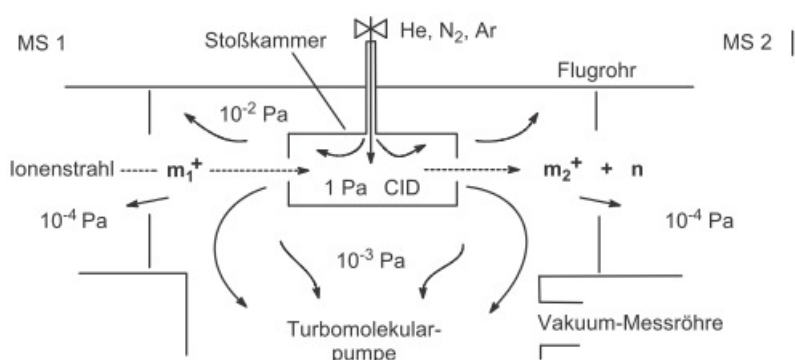
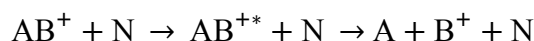
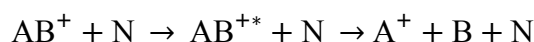


Abbildung 1-17: Schematischer Aufbau einer Kollisionszelle (Gross, 2013).

Der Ionenstrahl wird durch eine Kapillare in eine Röhre mit geringem Volumen geleitet. Dort strömt ein Inertgas (Argon) ein. Die Turbomolekularpumpe saugt ausströmendes Gas ab, um einen Vakuumeinbruch zu vermeiden. Durch die Kollision der neutralen Gasmoleküle mit den geladenen Ionen AB^+ kommt es zur Fragmentierung. Die Fragmentierung kann dabei wie folgt stattfinden:



Durch die Kollision bildet sich die aktivierte Spezies AB^{+*} die anschließend durch Dissoziation in mögliche Fragmente übergeht. Durch einen nachgeschalteten Quadrupol (MS2) findet die Trennung der Fragmente statt. Über einen Elektronenmultiplier (Dynode) wird das Ionensignal verstärkt und anschließend elektronisch detektiert.

Über den Multiple Reaction Monitoring Modus (MRM-Modus), wie auch in dieser Arbeit angewendet, kann eine sehr empfindliche und selektive Quantifizierung erfolgen, da gezielt ein Precursor-Ion und daraus gebildete Produkt-Ionen betrachtet werden (Cohen Freue and Borchers, 2012).

2 Motivation und Zielsetzung

Antibiotika werden in verschiedensten Umweltmatrices (z.B. Gülle, Boden, Grund- und Oberflächenwasser) und auch in Pflanzen nachgewiesen. Die am häufigsten gefundenen Antibiotikawirkstoffe stammen aus den beiden Wirkstoffgruppen der Tetracycline und Sulfonamide. Tetracycline gelten als im Boden immobile Substanzen mit hohen Sorptionseigenschaften (Haller et al., 2002; Hamscher et al., 2005a; Pfeifer et al., 2002). Zu dem Persistenz- und Akkumulationsverhalten dieser Substanzklasse insbesondere im Oberboden wurden bereits zahlreiche Studien durchgeführt (Hamscher et al., 2002; Hamscher et al., 2000; Höper et al., 2003; Pawelzick et al., 2004). Eine Desorption dieser Stoffe im Laufe der Jahre ist denkbar (Bailey, 2015). Sulfonamide werden hingegen als mobile Substanzen beschrieben (Thiele-Bruhn, 2003). Über Positivbefunde im Wasser (Grund-, Trink-, Oberflächen- und Abwasser) (Boxall et al., 2002; Thiele-Bruhn, 2003) und deren Aufnahme in Pflanzen wurde mehrfach berichtet (Chitescu et al., 2013; Chitescu et al., 2012; Dolliver et al., 2007; Grote et al., 2006; Migliore et al., 1996). Aufgrund dessen und im Hinblick auf die hohen Abgabemengen (**Abbildung 1-1**, **Tabelle 1-1**) sind die Ausführungen in der vorliegenden Arbeit auf diese beiden Wirkstoffgruppen fokussiert. Insbesondere die subtherapeutischen Antibiotikagehalte, welche über pflanzliche und tierische Lebensmittel vom Menschen aufgenommen werden können, stehen im Verdacht, die Entwicklung von Resistenzen zu fördern und können möglicherweise allergische Reaktionen begünstigen (Aminov and Mackie, 2007; Chee-Sanford et al., 2009; Doyle, 2006; Gast and Stephens, 1988; Kelley et al., 1998; Knapp et al., 2010; Kumar et al., 2005b; Kumar et al., 2005a; Storteboom et al., 2010; Thiele-Bruhn and Beck, 2005).

Neben dem Verzehr tierischer Lebensmittel (**Kapitel 1.3.2**), können Menschen auch durch die Aufnahme pflanzlicher Lebensmittel einer unerwünschten Antibiotikaexposition über die Nahrung ausgesetzt sein, sofern diese mit antibiotikahaltiger Gülle gedüngt wurden. Für pflanzliche Lebensmittel sind derzeit keine Rückstandshöchstmengen gesetzlich festgelegt. Gemäß der nationalen Verzehrsstudie II des Max Rubner-Instituts aus dem Jahr 2013 werden mehr pflanzliche (621 g Tag⁻¹) als tierische (351 g Tag⁻¹) Lebensmittel verzehrt (Max Rubner-Institut, 2013)⁸. Zudem nimmt der Trend zum ausschließlichen Verzehr pflanzlicher Lebensmittel (vegetarische oder vegane Ernährungsweisen) in der heutigen Zeit stetig zu.

Zielsetzung dieser Arbeit ist es daher Antibiotikarückstände, insbesondere von Tetracyclinen und Sulfonamiden, in komplexen Umweltmatrices nachzuweisen, zu quantifizieren und das Aufnahme- und Verteilungsverhalten dieser beiden Antibiotikagruppen in der Umwelt bzw. in den Pflanzen zu analysieren und hinsichtlich möglicher Gefahren für Mensch und Tier nach Aufnahme zu bewerten. Hierzu sollte eine Multimethode zur simultanen Erfassung und Quantifizierung von Tetracyclinen und Sulfonamiden in komplexen Umweltmatrices wie Pflanzen, Gülle und Wasserproben mittels LC-MS/MS entwickelt, optimiert und validiert werden. Der LC-MS/MS-Messung sollte eine effiziente Probenaufarbeitungsmethode vorangestellt werden. Da sich im Laufe der Arbeit jedoch noch weitere Fragestellungen zu der Verlagerung der

⁸ Bei den angegebenen Zahlen handelt es sich um den arithmetischen Mittelwert aus der Befragung von Männern und Frauen.

Antibiotika im Boden der Lysimeterrohre und deren Verbleib in den Versuchsböden der Aufwuchsversuche ergaben, wurde die Probenvorbereitung um die Matrix Boden erweitert.

In Kooperation mit dem Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen (LLH) sollten Aufwuchsversuche in Mitscherlichgefäßen durchgeführt werden. Die Einarbeitung der Antibiotika in den Versuchsböden erfolgte gemäß guter Laborpraxis (GLP) über Gülle. Um möglichst praxisnahe Bedingungen zu realisieren, sollte die Gülle mit Chlortetracyclin, Doxycyclin, Sulfamethazin und Sulfamethoxazol in drei unterschiedlichen Konzentrationen (20, 50, 100 mg kg⁻¹ Gülle) dotiert und im Anschluss einer fermentativen Vorbehandlung in Reaktoren unterzogen werden. Im ersten Versuchsjahr sollte deutsches Weidelgras als Versuchspflanze gewählt werden, da dies sehr häufig als Futtermittel für Weidetiere dient. Eine indirekte Belastung des Menschen, aufgrund des Verzehrs der von diesem Tier gewonnenen Lebensmittel, könnte somit nach Kenntnis der Konzentrationen im Weidelgras abgeschätzt werden. Als Versuchsböden sollten zwei Bodenarten aus Nordhessen gewählt werden: Baunataler Löß und Volkmarser Sand. Hierdurch sollten mögliche Unterschiede auf das Antibiotikaaufnahmeverhalten in die Pflanze im Zusammenhang mit den Bodeneigenschaften betrachtet werden.

Im zweiten Versuchsjahr sollten Möhren als Versuchspflanze gewählt werden. Diese stehen in direktem Kontakt mit dem antibiotikabelasteten Boden. Durch die getrennte Untersuchung der Wurzeln, Schalen, Rüben und des Grüns, wären Aussagen über die Verteilung der Antibiotika in der Pflanze möglich. Die Güllelagerung sollte über zwei verschiedene Ansätze, die sich im Hinblick auf die Dauer, die Sauerstoffzufuhr und die Temperatur unterscheiden, simuliert werden. Der Einfluss der Güllenvorbehandlung auf eine mögliche Antibiotikaeliminierung, sowie Unterschiede im Aufnahmeverhalten durch die Pflanze sollte untersucht werden. Die Antibiotikazugabe sollte in einer Konzentration von 100 mg kg⁻¹ und vor der Güllelagerung vorgenommen werden. Als Versuchsboden sollte Sandboden Verwendung finden.

Die Verteilung der beiden Wirkstoffklassen im Boden und deren mögliche Infiltration bis in das Grundwasser sollte anhand von Lysimeterstudien im Labormaßstab untersucht werden. Um den Einfluss unterschiedlicher Bodeneigenschaften auf die Verlagerung der Substanzen im Boden und eine Auswaschung ins Sickerwasser zu untersuchen, sollten auch hier Volkmarser Sandboden und Baunataler Lößboden verwendet werden. Die Antibiotikaaufgabe sollte in Anlehnung an den Weidelgrasaufwuchs in drei verschiedenen Konzentrationen (20, 50, 100 mg kg⁻¹) über dotierte Gülle erfolgen. Diese sollte vor der Verwendung einer Fermentation unterzogen werden.

Ein weiteres Teilprojekt der vorliegenden Arbeit umfasste die Untersuchung hessischer Grundwasserproben. Diese sollten im Rahmen des Grundwassermessprogrammes des Hessischen Landesamtes für Naturschutz, Umwelt und Geologie (HLNUG) entnommen werden. Insgesamt standen im Rahmen dieses Messprogrammes 500 Messstellen zur Verfügung. Die Messdaten könnten erste Einschätzungen zu der möglichen Belastung hessischer Grundwässer mit den ausgewählten Antibiotika erlauben.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Für die praktischen Arbeiten im Labor wurden die im Folgenden aufgelisteten Geräte und Materialien verwendet (**Tabelle 3-1**). Hier nicht aufgeführte Geräte wurden bei den Methoden spezifiziert.

Tabelle 3-1: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Geräte	Verwendung	Modell / Hersteller
Analysenwaage	Chemikalien- und Probeneinwaage	BL 210S-OCE, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG
Automatisiertes Festphasen-Extraktions-System	Automatisierte Festphasen-Anreicherung und Aufreinigung von Lysimeter-Eluaten und ausgewählter Grundwasserproben	Dionex AutoTrace 280, Thermo Scientific
Laborschüttler	Extraktion von Feststoffproben	Reax 2, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Magnetrührer	Ansetzen von (Puffer)-Lösungen	Rotilabo MH15, Carl Roth GmbH & Co. KG
Messermühle	Zerkleinerung und Homogenisierung der Feststoffproben	Grindomix GM 200, Retsch GmbH
Mikrozentrifugengefäße, 1700 µL	Abfüllen filtrierter Grundwasserproben	VWR International
pH-Messgerät	Einstellen und Messen von pH-Werten	pH 315i, WTW GmbH
Pipetten 0,1 – 5000 µL	Probenentnahme	Research plus, Eppendorf AG
PP-Kurzgewindeflaschen, blickdicht 200 µL, 1500 µL	Messvials zum Abfüllen der Probenextrakte	VWR International

Geräte	Verwendung	Modell / Hersteller
Probenkonzentrator (mit Stickstoffzufuhr)	Einengen von Proben	Techne Dri-Block DB-3D, Bibby Scientific Limited
SPE-Kammer	Anreicherung und Aufreinigung von Feststoffproben	Macherey-Nagel
Spritzen, 3 mL	Filtration der LC-Proben	Omnifix [®] Solo, Braun Melsungen AG
Spritzenvorsatzfilter Ø: 0,2 µm	Filtration der LC-Proben	Chromafil, Macherey-Nagel
Spülmaschine	Reinigung von Glasgeräten	G7883 CD, Miele Professional
Trockenschrank	Ausheizen von Glasgeräten; Trockenmassebestimmung	Heratherm [®] OMH60, Thermo Fisher Scientific Inc.
Ultraschallbad (beheizt)	Ansetzen von Stammlösungen; Extraktion der Feststoffproben	Elmasonic P, Elma Schidbauer GmbH
Vortexmischer	Homogenisierung der Proben und Standards	RS-VF 10, Phoenix Instrument
Waage	Einwaage der Standards	MC 210S, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG
Zentrifuge	Zentrifugieren von Feststoffproben	3K15, SIGMA Laborzentrifugen GmbH
Zentrifugenröhrchen, PP, 15 mL	Extraktion der Feststoffproben	VWR International
Zentrifugenröhrchen, PP, blickdicht, 50 mL	Abfüllen von Grundwasserproben zur routinemäßigen Untersuchung	VWR International

Tabelle 3-2: *Verwendete SPE-Kartuschen.*

Kartusche	Sorbentmenge	Volumen	Hersteller
Oasis HLB	60 mg	3 mL	Waters, Eschborn
	200 mg	6 mL	
SampliQ OPT	60 mg	3 mL	Agilent Technologies
Strata-X	60 mg	3 mL	Phenomenex, Aschaffenburg
	200 mg	3 mL	

Tabelle 3-3: *Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel.*

Chemikalien	Qualität	Lieferant
Aceton	UHPLC-MS	Biosolve, Niederlande
Acetonitril	UHPLC-MS	Biosolve, Niederlande
Ameisensäure	99 %, UHPLC-MS	Biosolve, Niederlande
Citronensäure Monohydrat	≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH
Di-Natriumhydrogenphosphat	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich
Ethanol	≥ 99,8 %	Carl Roth GmbH
Essigsäureethylester	≥ 99,9 %, LC-MS Grade	Carl Roth GmbH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Molecular Biology Grade	Merck, Darmstadt
Isopropanol	UHPLC-MS	Biosolve, Niederlande
Methanol	UHPLC-MS	Biosolve, Niederlande
Natriumhydroxid	≥ 99,0 %	Carl Roth GmbH
Salzsäure	30 %	VWR International
Wasser	UHPLC-MS	Biosolve, Niederlande

3.2 Eingesetzte Zielanalyte und interne Standards

In dieser Arbeit verwendete Antibiotika und deren Metabolite bzw. Transformationsprodukte sind in **Tabelle 3-4** und **Tabelle 3-5** gelistet. Als interne Standards (**Tabelle 3-6**) zum Quantifizieren der Analyte in den Proben, wurden ¹³C-markierte Analoga der Sulfonamide verwendet. ¹³C-markierte oder deuterierte Standards der Tetracycline sind sehr teuer (>> 10.000,- €). Aufgrund dessen wurde die Quantifizierung der Tetracycline über Demeclocyclin als internem Standard vorgenommen. Dieser Antibiotikawirkstoff ist nicht im Anhang der VO (EU) Nr. 37/2010 gelistet und darf folglich nicht für die Behandlung von Tieren eingesetzt werden (VO (EU) Nr. 37/2010, 2010). Das Vorkommen dieses Wirkstoffes in der Umwelt wird daher als unwahrscheinlich eingestuft (Aronson, 1980; Zhu et al., 2001).

Tabelle 3-4: *Verwendete Antibiotika.*

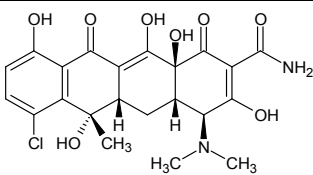
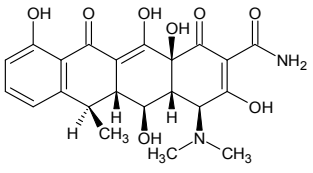
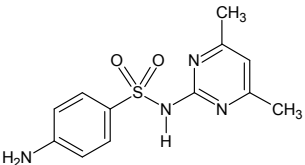
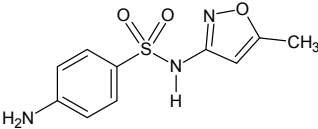
Antibiotika	Strukturformel	CAS-Nr.	Qualität	Lieferant
Chlortetracyclin CTC		64-72-2	≥ 93 %	Sigma-Aldrich
Doxycyclin DOX		24390-14-5	≥ 95 %	Sigma-Aldrich
Sulfamethazin SMZ		57-68-1	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
Sulfamethoxazol SMX		723-46-6	≥ 99 %	Sigma-Aldrich

Tabelle 3-5: *Verwendete Metabolite und Transformationsprodukte.*

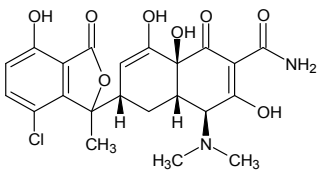
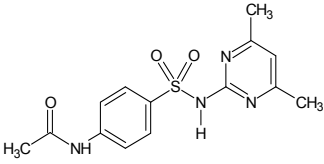
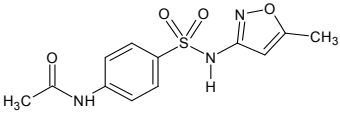
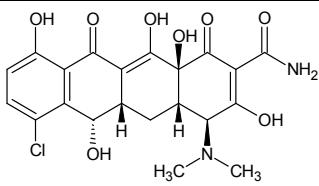
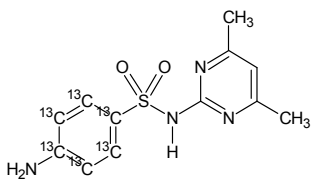
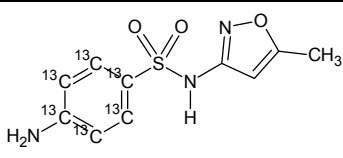
Metabolite und Transformationsprodukte	Strukturformel	CAS-Nr.	Qualität	Lieferant
Iso-Chlortetra- cyclin Iso-CTC		514-53-4	95 %	Santa-Cruz-Biotechnology
<i>N</i> -Acetyl-Sulfa- methazin <i>N</i>-Ac-SMZ		100-90-3	98 %	Santa-Cruz-Biotechnology
<i>N</i> -Acetyl-Sulfa- methoxazol <i>N</i>-Ac-SMX		21312-10-7	≥ 98 %	Santa-Cruz-Biotechnology

Tabelle 3-6: *Verwendete Interne Standards.*

Interne Standards	Strukturformel	CAS-Nr.	Qualität	Lieferant
Demeclocyclin DEM		64-73-3	≥ 93 %	Sigma-Aldrich
Sulfamethazin- phenyl- ¹³ C ₆ SMZ- ¹³ C ₆		1196157- 77-3	≥ 97 %	Sigma-Aldrich
Sulfamethoxazol- phenyl- ¹³ C ₆ SMX- ¹³ C ₆		1196157- 90-0	≥ 99 %	Sigma-Aldrich

3.3 Ansetzen von Lösungen

3.3.1 Puffersysteme

Citronensäure-Phosphat-Puffer nach McIlvaine (McIlvaine, 1921)

McIlvaine-Puffer setzt sich aus 0,1 M Citronensäure- und 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung zusammen. Durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse der beiden Stammlösungen lassen sich verschiedene pH-Werte von 2,2 bis 8 einstellen. Eine Nachjustierung des pH-Wertes ($\pm 0,1$) wurde mit Salzsäure (30 %ig) oder Natriumhydroxid (≥ 99 %) vorgenommen.

0,1 M Citronensäure-Lösung (Lösung A)

21,04 g Citronensäure ($M = 210,04 \text{ g mol}^{-1}$) wurden in 1 L UPLC-Wasser gelöst.

0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (Lösung B)

28,39 g Dinatriumhydrogenphosphat ($141,96 \text{ g mol}^{-1}$) wurden in 1 L UPLC-Wasser gelöst.

McIlvaine-Puffer pH 4 mit EDTA-Zusatz

Zum Ansetzen eines McIlvaine-Puffers mit einem pH-Wert von 4 wurden 614 mL Lösung A mit Lösung B ad 1 L aufgefüllt. Vorab wurden 37,2 g EDTA für den 0,1 M Ansatz und 16,6 g EDTA für den 0,05 M Ansatz zugegeben.

1 M Citrat-Puffer (pH 4,7)

210,04 g Citronensäure ($M = 210,04 \text{ g mol}^{-1}$) wurden in 1 L Wasser (UPLC-Qualität) gelöst (Hamscher et al., 2002). Eine Nachjustierung auf $\text{pH } 4,7 \pm 0,1$ wurde mit Salzsäure (30 %ig) oder Natriumhydroxid ($\geq 99 \%$) vorgenommen.

3.3.2 Stamm- und Kalibrierlösungen

Für die Durchführung von Optimierungsversuchen, sowie für die Ermittlung der Verfahrenskenndaten und für das Ansetzen von Matrixkalibrierungen wurde antibiotikafreie Gülle dotiert. Hierzu wurde ein Mischstandard (Standard II, $c = 10 \text{ mg L}^{-1}$) bestehend aus Chlortetracyclin, iso-Chlortetracyclin, Doxycyclin, Sulfamethazin, *N*-Acetyl-Sulfamethazin, Sulfamethoxazol und *N*-Acetyl-Sulfamethoxazol in Methanol verwendet. Als Ausgangslösungen hierfür dienen Einzelstammlösungen mit einer Analytkonzentration von je 1 g L^{-1} in Methanol (Standard I). Zum Erhalt des Standard I, wurden je 5 mg Antibiotikum in einen 5 mL-Messkolben eingewogen und mit Methanol ad Marke aufgefüllt. Bei der Einwaage wurde die Reinheit des jeweiligen Antibiotikums mitberücksichtigt. Je nach Matrix und Fragestellung wurden unterschiedliche Kalibrationslösungen benötigt. Diese sind in **Tabelle 3-7** und **Tabelle 3-8** aufgeführt. Die Aufbewahrung der Einzelstammlösungen und des Standard II erfolgte über 2 Monate im Gefrierschrank bei $-28 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Kalibrierlösungen wurden nutzungstüchtig frisch angesetzt.

Tabelle 3-7: Standards für den Nachweis von Antibiotikarückständen in Gülle, Weidelgras und Möhren (Möhrengrün, Möhrenrübe, Möhrenschnitz, Möhrenwurzeln).

Analyt	Misch-Standard II	Kalibrier-Standard III	Kalibrier-Standard IV	Kalibrier-Standard V
	je 50 μL Standard I ad 5 mL Methanol	arbeitstüchtig 50 μL Standard II ad 5 mL Wasser	arbeitstüchtig 250 μL Standard II ad 5 mL Wasser	je 500 μL Standard I ad 5 mL Wasser
	[mg L^{-1}]	[$\mu\text{g L}^{-1}$]	[$\mu\text{g L}^{-1}$]	[mg L^{-1}]
CTC	10	100	500	100
Iso-CTC				
DOX		Für die Bestimmung der NG und BG im unteren $\mu\text{g kg}^{-1}$ -Bereich	Für die Messung von Proben im $\mu\text{g kg}^{-1}$ -Bereich	Für die Messung von Proben im mg kg^{-1} -Bereich
SMZ				
SMX				
<i>N</i>-Acetyl-SMZ				
<i>N</i>-Acetyl-SMX				

Tabelle 3-8: Standards für den Nachweis von Antibiotikarückständen in Wasserproben über Direktinjektion (Standard VI und VII) und automatisierte Festphasenextraktion an einem AutoTrace (Standard VIII und IX) bei einem Anreicherungsvolumen von 200 mL.

Analyt	Kalibrier- Standard VI	Kalibrier- Standard VII	Kalibrier- Standard VIII	Kalibrier- Standard IX
	arbeitstäglich 50 µL Standard II ad 5 mL Methanol	arbeitstäglich 500 µL Standard VI ad 10 mL Wasser	arbeitstäglich 10 µL Standard II ad 10 mL Wasser	arbeitstäglich 500 µL Standard II ad 5 mL Wasser
	[µg L ⁻¹]	[µg L ⁻¹]	[µg L ⁻¹]	[mg L ⁻¹]
CTC	100	5	10	1
Iso-CTC		Für die Bestimmung der Validierungskenndaten und der Proben in einem Konzentrationsbereich von 25 bis 500 ng L ⁻¹	Für die Bestimmung der Validierungskenndaten und der Proben in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 50 ng L ⁻¹	Für die Bestimmung der Proben in einem Konzentrationsbereich ab 50 ng L ⁻¹
DOX				
SMZ				
SMX				
N-Acetyl-SMZ				
N-Acetyl-SMX				

3.3.3 Interne Standardlösungen (ISTD)

Die verwendeten internen Standards Demeclocyclin, Sulfamethazin-¹³C₆ und Sulfamethoxazol-¹³C₆ wurden als Einzelstammlösungen in einer Konzentration von 1 g L⁻¹ angesetzt. Hierzu wurden je 5 mg der jeweiligen Substanz in 5 mL Methanol gelöst. Aus diesen Einzelstammlösungen wurde ein Mischstandard **ISTD 1** angesetzt. Für die Quantifizierung von Antibiotikarückständen in verschiedenen Matrices, wurde dieser **ISTD 1** in unterschiedlichen Verdünnungsstufen verwendet (**Tabelle 3-9**).

Tabelle 3-9: Pipettierschema zum Ansetzen der internen Standardlösungen.

Kalibrierstandard	Entnahmevolumen aus der Stammlösung ad 5 mL MeOH	ISTD 1 ^a	ISTD 2 ^b 250 µL ISTD 1 ad 10 mL MeOH	ISTD 3 ^c 100 µL ISTD 2 ad 10 mL MeOH
Demeclocyclin	2500 µL	500 mg L ⁻¹	12,5 mg L ⁻¹	125 µg L ⁻¹
Sulfamethazin-¹³C₆	500 µL	100 mg L ⁻¹	2,5 mg L ⁻¹	25 µg L ⁻¹
Sulfamethoxazol-¹³C₆	500 µL	100 mg L ⁻¹	2,5 mg L ⁻¹	25 µg L ⁻¹

^aISTD 1: Gülle im mg kg⁻¹-Bereich; ^bISTD 2: Gülle im µg kg⁻¹-Bereich, Weidelgras, Möhrengrün, Möhrenrübe, Möhrenschaalen, Möhrenwurzeln, Bodeneluate (Anreicherungsverfahren); ^cISTD 3: Grundwasser (Direktinjektionsverfahren).

3.3.4 Ansetzen von Matrixkalibrierungen

Zum Ansetzen der Matrixkalibrierfunktion wurde analytfreie Matrix⁹ in mindestens fünf verschiedenen Konzentrationsniveaus dotiert und analog der Proben aufgearbeitet. Zusätzlich wurde ein Blindwert¹⁰ mitgemessen.

Tabelle 3-10: Pipettierschema zum Ansetzen der Matrixkalibrierung am Beispiel Möhrenwurzeln (Einwaage: 1 g).

Kalibrierstandard	Standardlösung III (c = 100 µg L ⁻¹)	Standardlösung IV (c = 500 µg L ⁻¹)	ISTD 2 (siehe Tabelle 3-9)
Blindwert	-	-	20 µL
0,5 µg kg ⁻¹	5 µL	-	20 µL
2,5 µg kg ⁻¹	25 µL	-	20 µL
5 µg kg ⁻¹	-	10 µL	20 µL
10 µg kg ⁻¹	-	20 µL	20 µL
20 µg kg ⁻¹	-	40 µL	20 µL
30 µg kg ⁻¹	-	60 µL	20 µL
40 µg kg ⁻¹	-	80 µL	20 µL
50 µg kg ⁻¹	-	100 µL	20 µL

3.4 Vorbehandlung von Glasgeräten

Alle verwendeten Glasgeräte, welche mit Antibiotika in Berührung kamen, wurden mit Aceton vorgespült und für mindestens vier Stunden bei 200 °C im Trockenschrank ausgeheizt. Wenn die Verwendung von Glas vermieden werden konnte, wurde es durch Kunststoff ersetzt (vgl. **Kapitel 1.8.2**). Die Aufbewahrung von Standardlösungen erfolgte in PP-Zentrifugenröhrchen und die Analysenextrakte wurden in braune PP-Messvials abgefüllt.

3.5 Bestimmung der Trockenmasse

Die Bestimmung des Trockenrückstandes wurde in Anlehnung an die DIN ISO 11465:1996-12 zur „Bodenbeschaffenheit - Bestimmung des Trockenrückstandes und des Wassergehalts auf Grundlage der Masse - gravimetrisches Verfahren“ durchgeführt (DIN ISO 11465:1996-12, 1996). Neben Bodenproben wurden auch die Trockenmassen für Weidelgras, Möhrenrübe, Möhrenschnitz, Möhrengrün und Möhrenwurzeln über dieses Verfahren ermittelt. Die Einwaage (in Dreifachbestimmung) erfolgte in Aluschälchen und richtete sich nach der zur Verfügung stehenden Probenmenge (je nach Matrix zwischen 5 und 15 g). Die Trocknung erfolgte bei 103 ± 2 °C im Trockenschrank über einen Zeitraum von drei Tagen bis zur Gewichtskonstanz. Diese wurde durch mehrmaliges Wiegen ermittelt. Aus der Dreifachbestimmung wurde der arithmetische Mittelwert gebildet.

⁹ Pflanzenmaterial der Kontrollansätze (Weidelgras: Varianten 1, 2, 15 und 16 (**Tabelle 3-12**); Möhren: Varianten 1 und 2 (**Tabelle 3-13**)).

¹⁰ Pflanzenmaterial der Kontrollansätze mit ISTD-Zusatz. Die Aufarbeitung erfolgte analog der Kalibrierstandards und Proben.

3.6 Aufwuchsversuche (Gefäßversuche)

Das Ziel der Aufwuchsversuche bestand darin, das Aufnahme- und Verteilungsverhalten ausgewählter Antibiotika in Pflanzen zu untersuchen. Antibiotikahaltige Gülle, welche als Düngemittel in den Boden eingearbeitet wurde, diente dabei als Vehikel.

3.6.1 Versuchsanlage

Alle im Rahmen der Dissertation durchgeführten Aufwuchsuntersuchungen wurden beim Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen (LLH) in Kassel-Harleshausen durchgeführt. Dort befindet sich eine rotierende Versuchsanlage mit Mitscherlichgefäßen, welche für die Untersuchungen genutzt wurde (**Abbildung 3-1**).



Abbildung 3-1: Versuchsanlage des Landesbetriebes Landwirtschaft Hessen in Kassel-Harleshausen.

Die Bewässerung erfolgte automatisiert, sodass allen Pflanzen die gleiche Wassermenge zur Verfügung stand. Die Licht- und Temperaturverhältnisse wurden durch die natürlicherweise herrschenden Wetterbedingungen bestimmt. Die Wetterdaten zum Zeitpunkt der Aufwüchse können über die Homepage des LLHs unter Auswahl der Wetterstation „Harleshausen“ über den folgenden Link abgerufen werden: http://pflanzenproduktion.llh-hessen.de/wetter/aws_monate_anz.php (zuletzt geprüft im Juni 2018).

3.6.2 Versuchsbeschreibung zur Aufwuchsstudie 2014: Deutsches Weidelgras

3.6.2.1 Auswahl des Saatgutes

Als Pflanze für den Aufwuchsversuch 2014 wurde einjähriges Deutsches Weidelgras der Sorte „Lemmos“ gewählt. Dieses Weidelgras dient häufig als Futtermittel für Weidetiere und kann wegen seines schnellen Wachstums mehrfach pro Jahr geschnitten und die einzelnen Schnitte getrennt voneinander analysiert werden. Die Aufwuchsperiode begann am 15.04.2014 und endete am 14.08.2014. Innerhalb dieser Zeitspanne wurden fünf Weidelgrasschnitte geerntet und auf ihren Antibiotikagehalt untersucht. Der Grasschnitt erfolgte ca. 1 – 2 cm über der Bodenoberfläche.

3.6.2.2 *Gülleproben, Dotierungen und Vorbehandlung durch Fermentation*

Für die Versuche wurde wirkstofffreie Rindergülle vom Landesbetrieb Hessisches Landeslabor „Eichhof“ des Standortes Bad Hersfeld bereitgestellt. Vor Ort wurde die Gülle mit Antibiotika (Chlortetracyclin, Doxycyclin, Sulfamethoxazol und Sulfamethazin) in drei verschiedenen Konzentrationen von jeweils 20 mg kg⁻¹, 50 mg kg⁻¹ und 100 mg kg⁻¹ dotiert. Die Festlegung der Dotierniveaus erfolgte in Abstimmung aller Kooperationspartner in Anlehnung an nachgewiesene Antibiotikakonzentrationen in realen Gülleproben (**Tabelle A-1** und **Tabelle A-2**). Eine Konzentration von 20 mg kg⁻¹ sollte einer realen und 50 mg kg⁻¹ einer hohen Belastung entsprechen. Die 100 mg kg⁻¹ Dotierung sollte ein worst-case-Szenario darstellen. Die Dotierung erfolgte als Einzelsubstanzen um eine mögliche Störung der Antibiotika untereinander ausschließen zu können. Zudem wurde ein Blindwert ohne Antibiotikazusatz angesetzt. Dieser diente zum Ansetzen von Matrixkalibrierungen für die Quantifizierung der Analyten in den Gülleproben.

Vor der Einarbeitung der Gülle in den Versuchsboden wurde diese über einen Zeitraum von 35 Tagen fermentiert. Die Fermentationsdauer wurde von den Kooperationspartnern (LLH, JLU Gießen, LHL) festgelegt. Die Fermentation fand in Reaktoren mit einem Fassungsvermögen von 20 Litern bei 38 – 40 °C im Wasserbad unter anaeroben Bedingungen statt. Ein Rührwerk in den Reaktoren sorgte für eine kontinuierliche Durchmischung der Gülleansätze. Hilfsstoffe (z.B. Enzyme, Mikroorganismen, Entschäumer) (Henkelmann et al., 2018) wurden dem Fermentationsansatz nicht zugesetzt. Zur Beurteilung einer möglichen Antibiotikaeliminierung während der Fermentation, wurden die Gülleproben nach der Vorbehandlung auf ihren Antibiotikagehalt untersucht. Der nachgewiesene Antibiotikagehalt in der Gülle diente als Ausgangswert für die Berechnung der Antibiotika-Transferraten in die Pflanzen.

3.6.2.3 *Bodenproben und Charakterisierung der verwendeten Versuchsböden*

Für den Weidelgrasaufwuchs wurden zwei verschiedene Bodenarten gewählt, die sich im Hinblick auf ihre physikalisch-chemische Zusammensetzung unterscheiden. Hierbei handelt es sich um typische Böden für die Region Nordhessen:

- Volkmarser Sand,
- Baunataler Löß.

Die physikalisch-chemischen Bodeneigenschaften wurden vom LLH bestimmt und sind in **Tabelle 3-11** aufgeführt. Die Böden wurden vor dem Einfüllen in die Mitscherlichgefäße gesiebt (**Kapitel 5.3.1**) und gerüttelt. Die Untersuchung der Bodenproben auf Antibiotikarückstände erfolgte nach der Ernte der Pflanzen. Für die Homogenisierung der Bodenproben wurden diese von Mitarbeitern des LLHs aus dem Mitscherlichgefäß in eine große Schale überführt und händisch durchmischt. Eine Teilprobe wurde für die Laboranalyse in Plastikbeutel abgefüllt.

Tabelle 3-11: Kenndaten der verwendeten Böden im Gefäß- und Lysimeterversuch. Die Daten wurden vom LLH bestimmt und wie folgt an den LHL übermittelt:

Bodeneigenschaft	Volkmarser Sand	Baunataler Löß
pH-Wert	6,8	7,4
Phosphat als Phosphorpentoxid (P ₂ O ₅)	32 mg/100 g Boden	34 mg/100 g Boden
Kaliumoxid (K ₂ O)	10 mg/100 g Boden	18 mg/100 g Boden
Magnesium	3 mg/100 g Boden	20 mg/100 g Boden
Organischer Kohlenstoff (c _{org})	0,55 %	0,88 %
Gesamt-Stickstoff (N _t)	0,06 %	0,11 %
Humus-Qualität (C _{org} /N _t)	9,17	8
Kupfer	2,036 mg/100 g Boden	1,98 mg/100 g Boden
Zink	2,085 mg/100 g Boden	3,7 mg/100 g Boden
Mangan	85,8 mg/100 g Boden	16,7 mg/100 g Boden
Bor	0,174 mg/100 g Boden	0,105 mg/100 g Boden
Molybdän	< 0,015 mg/kg Boden	< 0,0052 mg/kg Boden
Sand	72,9 %	3,3 %
Schluff	19,1 %	76,4 %
Ton	8,0 %	20,3 %

3.6.2.4 Versuchsdurchführung

Zu Beginn wurden die insgesamt 112 Mitscherlichgefäße mit je 6,5 kg des jeweiligen Versuchsbodens befüllt. 0,5 kg der fermentierten Rindergülle wurde auf den Boden aufgebracht und mit weiteren 0,5 kg Boden abgedeckt¹¹. Die Gülle wurde zur besseren Verteilung im Boden über Nacht einsickern lassen. Am Folgetag erfolgte die Aussaat. Hierzu wurden jedem Gefäß 1,2 g Saatgut des einjährigen Weidelgrases der Sorte „Lemmos“ zugesetzt. Der erste Weidelgrasschnitt wurde ca. einen Monat nach der Aussaat geerntet. Im folgenden Zeitstrahl (**Abbildung 3-2**) ist die zeitliche Abfolge der Versuchsdurchführung mit den genauen Erntezeitpunkten der insgesamt fünf Weidelgrasschnitte im Aufwuchszeitraum vom 15.04. bis 15.08.2014 aufgeführt.

¹¹ In Anlehnung an reale Feldbedingungen zur Simulation des Unterpflügens.



Abbildung 3-2: Übersicht zur zeitlichen Abfolge der Versuchsdurchführung des Aufwuchses 2014: Deutsches Weidelgras.

3.6.2.5 Probenübersicht mit Erntemengen

Durch die Einzelaufgabe der Antibiotika in jeweils drei unterschiedlichen Konzentrationen und der Verwendung zweier Versuchsböden ergaben sich 28 Varianten. Jede Variante wurde in 4-facher Wiederholung (4 Mitscherlichgefäße) angesetzt. Aus den Wiederholungen wurde nach der Ernte eine Mischprobe gebildet und auf den Antibiotikagehalt untersucht. Hieraus ergaben sich 140 Proben. Die Aufarbeitung dieser Proben erfolgte in Dreifachbestimmung. **Tabelle 3-12** zeigt eine Übersicht der Varianten und die erhaltenen Ernteerträge. Die ermittelten Trockenmassen in % sind im digitalen Anhang für Proben mit Positivbefund aufgeführt.

Tabelle 3-12: Variantenübersicht und Ernteerträge des Weidelgrasaufwuchses 2014.

Variante/a-d	Boden	Analyt	Konz. [mg/kg Gülle]	Erntemengen				
				1.Schnitt	2.Schnitt	3.Schnitt	4.Schnitt	5.Schnitt
				gFM	gFM	gFM	gFM	gFM
1	Volkmarser Sandboden	-	- ¹	36,2	12,3	10,6	61,6	14,2
2		-	- ²	37,4	78,9	74,6	47,1	17,4
3		CTC	20	35,0	81,1	89,0	53,8	19,5
4		CTC	50	37,8	85,4	90,6	54,4	20,2
5		CTC	100	41,0	80,9	85,9	53,0	19,7
6		DOX	20	26,8	99,1	87,9	49,7	19,1
7		DOX	50	29,5	93,3	88,2	48,1	17,6
8		DOX	100	33,6	92,1	85,5	48,7	20,1
9		SMX	20	39,1	96,5	80,8	49,4	18,8
10		SMX	50	42,7	111,2	74,6	53,7	19,5
11		SMX	100	36,9	121,9	76,2	51,8	22,3
12		SMZ	20	28,0	117,9	68,7	55,6	18,3
13		SMZ	50	38,2	106,4	73,1	50,3	20,2
14		SMZ	100	54,6	112,5	62,4	52,9	19,7
15	Baunataler Lößboden	-	- ¹	54,4	39,8	27,4	77,1	38,4
16		-	- ²	74,5	113,4	76,4	68,0	44,3
17		CTC	20	74,5	94,9	71,8	57,6	36,2
18		CTC	50	73,8	79,0	78,7	63,9	45,4
19		CTC	100	66,6	90,6	81,4	62,3	44,5
20		DOX	20	70,6	93,0	82,4	71,1	46,7
21		DOX	50	69,7	97,9	80,6	69,0	41,4
22		DOX	100	64,5	96,1	87,6	70,9	41,5
23		SMX	20	90,7	96,9	77,3	76,0	44,9
24		SMX	50	80,9	96,8	68,7	67,5	46,1
25		SMX	100	92,0	84,9	66,5	62,7	35,1
26		SMZ	20	80,5	105,0	68,6	63,2	38,6
27		SMZ	50	72,6	101,0	71,3	55,2	37,9
28		SMZ	100	79,5	102,3	74,8	72,3	39,4

¹Blindwert ohne Gülle, ²Blindwert mit antibiotikafreier Gülle

3.6.3 Versuchsbeschreibung zur Aufwuchsstudie 2015: Möhren

3.6.3.1 Auswahl des Saatgutes

Als Pflanze für den Aufwuchsversuch 2015 wurden Möhren der Sorte „Almaro“ gewählt. Im Unterschied zum Weidelgras, wo lediglich oberirdisch gewachsene Halme geerntet und analysiert wurden, steht das Wurzelgemüse in direktem Kontakt zu dem antibiotikahaltigen Gülle-Boden-Gemisch. Möhren sind komplett verzehrfähig und können auch im rohen Zustand von Menschen konsumiert werden. Manche Bestandteile der Möhren (Möhrengrün, Möhrenschaale und Möhrenwurzeln) werden jedoch für gewöhnlich nicht verzehrt. Die Aufwuchsperiode begann am 06.04.2015 und endete am 06.08.2015 mit der Ernte der Möhren.

3.6.3.2 Gülleproben, Dotierungen und Vorbehandlung durch Fermentation und Lagerung

Für die Versuche wurde erneut Rindergülle vom LHL „Eichhof“ in Bad Hersfeld bereitgestellt. Dort wurde die Gülle mit Antibiotika (CTC, DOX, SMZ, SMX) in der „worst-case“ Konzentration von 100 mg kg^{-1} dotiert. Die Dotierung erfolgte ebenfalls als Einzelsubstanzen. Die Gülle wurde vor deren Ausbringung auf die Versuchsböden zwei unterschiedlichen Vorbehandlungen unterzogen: anaerobe Fermentation und aerobe Lagerung. Die Fermentation der Gülle erfolgte über einen Zeitraum von 40 Tagen unter den gleichen Bedingungen wie bei dem Weidelgrasaufwuchs des Vorjahres (**Kapitel 3.6.2.2**). Eine weitere, in der Landwirtschaft übliche Art der GÜllavorbehandlung, ist die Lagerung. Für den durchgeführten Versuch wurde diese über einen Zeitraum von 8 Tagen im Dunkeln bei einer Temperatur von $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Die Durchmischung erfolgte manuell unter Zuhilfenahme einer Schöpfkelle. Im Unterschied zu dem Aufwuchs 2014 wurden über den kompletten Verlauf der Fermentation und Lagerung an unterschiedlichen Tagen 50 mL der Gülleproben entnommen und auf ihren Antibiotikagehalt untersucht. Die Untersuchung dieser Gülleproben sollte die Eliminierung der Antibiotika im Verlauf des jeweiligen Vorbehandlungsschrittes aufzeigen und diente gleichzeitig als Ausgangswert für die Berechnung der Antibiotika-Transferraten in die Möhren.

3.6.3.3 Charakterisierung des verwendeten Versuchsbodens

Für den Möhrenaufwuchs wurde Volkmarser Sand als Versuchsboden gewählt. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften sind in **Tabelle 3-11** aufgeführt. Die Untersuchung der Bodenproben auf Antibiotikarückstände erfolgte nach der Ernte der Möhren. Die Probenahme erfolgte in Anlehnung an das Vorjahr (vgl. **Kapitel 3.6.2.3**).

3.6.3.4 Versuchsdurchführung

Zu Beginn wurden die insgesamt 40 Mitscherlichgefäße mit je 6 kg Volkmarser Sandboden befüllt. 0,5 kg der fermentierten bzw. gelagerten Rindergülle wurde auf den Boden aufgebracht und mit 0,5 kg Boden abgedeckt. Die Gülle wurde zur besseren Verteilung im Boden über Nacht einsickern lassen. Am Folgetag erfolgte die Aussaat der Möhrensamen. Um den Möhrenrüben ausreichend Platz zum Wachsen zu belassen, wurden pro Gefäß nur vier Möhrenpflanzen aufgezogen.

3.6.3.5 Probenübersicht mit Ernteträgen

Auch bei dem Möhrenaufwuchs ergaben sich durch die Verwendung verschieden vorbehandelter Rindergüllen insgesamt zehn Varianten. Jede Variante wurde in 4-facher Wiederholung angesetzt (a – d). Untersucht wurden drei dieser Wiederholungen (a, c, d), die vierte (b) diente als Rückstellprobe. Die drei zur Untersuchung herangezogenen Wiederholungen wurden getrennt jeweils in Doppelbestimmung aufgearbeitet und untersucht. Aus diesen sechs unabhängigen Bestimmungen wurde der arithmetische Mittelwert als Ergebnis angegeben. Die Möhrenuntersuchung auf Antibiotikarückstände erfolgte zudem getrennt in Möhrenwurzel, Möhrenschaale, Möhrenrübe und Möhrengrün. Nach der Ernte wurden die Möhren mit deionisiertem Wasser gewaschen und mit einem Küchentuch abgetrocknet. Nach dem Abtrennen des Grüns und der Wurzel wurde die Möhre geschält und alle Kompartimente mittels Messermühle zerkleinert. Es ergaben sich somit insgesamt 240 Einzelmessungen. **Tabelle 3-13** zeigt eine Übersicht der Varianten und die erhaltenen Erntemengen. Die ermittelten Trockenmassen in % sind für Varianten mit Positivbefunden bestimmt worden und im digitalen Anhang aufgeführt.



Abbildung 3-3: Erhaltene Ernteträge des Möhrenaufwuchses 2015.

Tabelle 3-13: Variantenübersicht und Erntemengen des Möhrenaufwuchses 2015.

Variante/a, c, d	Boden	Güllevorbehandlung	Analyt	Konz. [mg/kg Gülle]	Erntemengen [g _{FM}] ³			
					Möhrengrün	Möhrenrübe	Möhrenschaale	Möhrenwurzel
1	Volkmarser Sandboden	-	-	- ¹	51,9	219,3	46,2	1,6
2		-	-	- ²	212,7	765,0	81,0	4,9
3		Lagerung	CTC	100	265,8	693,0	126,6	4,9
4			DOX	100	232,2	807,0	96,0	5,5
5			SMX	100	216,0	798,0	117,6	4,5
6			SMZ	100	239,4	792,0	109,8	6,6
7		Fermentation	CTC	100	209,4	714,0	105,9	6,8
8			DOX	100	231,0	798,0	86,4	7,5
9			SMX	100	213,6	750,0	101,4	5,1
10			SMZ	100	213,6	825,0	99,6	5,1

¹Blindwert ohne Gülle, ²Blindwert mit antibiotikafreier Gülle, ³Mittelwert aus 12 untersuchten Möhren

3.7 Lysimeterversuche

Über Lysimeterstudien im Labormaßstab sollte die Verlagerung von Tetracyclinen und Sulfonamiden im Boden und deren mögliche Infiltration bis in das Grundwasser untersucht werden.

3.7.1 Versuchsbeschreibung zur Lysimeterstudie im Labormaßstab

Die Lysimeterstudien wurden am LHL Eichhof in Bad Hersfeld durchgeführt. Dort wurden insgesamt 52 Kunststoffrohre mit einem Durchmesser von 7 cm und einer Länge von 50 cm aufgestellt (**Abbildung 3-4**).



*Abbildung 3-4: Lysimeterrohre im Labormaßstab.
Versuchsaufbau beim LHL Eichhof in Bad Hersfeld.*

3.7.1.1 Gülleproben, Dotierungen und Vorbehandlung durch Fermentation

Die Antibiotikaaufgabe erfolgte, wie bei den Aufwuchsversuchen, als Einzelsubstanzen über fermentierte Rindergülle. Die Dotierung der Gülle wurde auf drei verschiedenen Konzentrationsniveaus (20, 50 und 100 mg kg⁻¹) vorgenommen. Im Anschluss an die Dotierung wurde die Fermentation vor Ort beim Eichhof durchgeführt. Hierzu wurden die gleichen Ansätze, wie bereits für den Weidelgrasaufwuchs 2014, verwendet (vgl. **Kapitel 3.6.2.2**).

3.7.1.2 Charakterisierung der verwendeten Versuchsböden

Für die Versuche wurden, in Anlehnung an den Weidelgrasaufwuchs, Volkmarser Sand und Baunataler Löß gewählt. Die physikalisch-chemischen Bodeneigenschaften wurden vom LLH bestimmt und sind **Tabelle 3-11** zu entnehmen.

3.7.1.3 Versuchsdurchführung

Am 30.06.2014 wurden die Rohre mit 2,5 kg Boden befüllt. Anschließend wurden einmalig 16 g Gülle oberflächlich auf die Lysimeter aufgebracht (eine Einarbeitung in den Boden erfolgte nicht). Die Güllemenge von 16 g je Lysimeter richtete sich nach dem Flächeninhalt der Schnittfläche. Dieser betrug für die vorliegenden Lysimeterrohre $38,5 \text{ cm}^2$. Für die Gülleaufgabe wurden 40 t / ha zugrunde gelegt, da Gaben von 2 x 20 t / ha und Jahr nach Auskunft des Eichhofs häufig vorgenommen werden. Am Eichhof wurde nach der Fermentation eine Nährstoffanalyse der verwendeten Gülle durchgeführt. Gemäß dieser betrug der Gesamtstickstoffgehalt 3,508 kg / t Gülle. Laut § 6 Abs. 4 DüV dürfen aus Wirtschaftsdüngern tierischer Herkunft (...) Nährstoffe nur so ausgebracht werden, dass die aufgebrachte Menge an Gesamtstickstoff (...) 170 kg / ha und Jahr nicht überschreitet (DüV, 2017). Bei dem vorliegenden Versuchsansatz betrug die Menge an Gesamt-N 146 kg / ha und war somit konform mit der Düngerverordnung und stellte zusätzlich einen praxisnahen Wert dar.

Täglich wurden 10 mL deionisiertes Wasser auf die Rohre aufgegeben. Die Menge entspricht einer jährlichen Niederschlagsmenge von 950 L m^2 . Zur Vermeidung von Verdunstung wurden die Rohre an deren Oberfläche mit einer Petrischale abgedeckt. Am unteren Ende erfolgte die Abdichtung mit einem Kunststoffdeckel. In diesen wurde ein Loch gebohrt und ein Schlauch zum Ablauf des aufgegebenen Wassers angebracht. Die Eluate wurden wöchentlich (ca. 50 mL) in 100 mL Kunststoffgefäßen aufgefangen. Um später eine Bilanzierung vornehmen zu können, wurden die exakten Rückwaagen der erhaltenen Eluate notiert. Die Proben wurden bis zur Analyse bei $+5 \text{ °C}$ in einer Kühlzelle gelagert. Am 16.01.2017 wurden die Säulen 7, 33, 13, 39, 19, 45, 25 und 51 abgebaut. Diese acht Säulen sollten zur Untersuchung der Antibiotikaverteilung in den einzelnen Bodenschichten des jeweiligen Lysimeterrohrs dienen. Hierzu wurden die Rohre an deren Ober- und Unterseite abgedichtet, bei -28 °C eingefroren und im gefrorenen Zustand in Abständen von 5 cm mit einem Winkelschleifer durchgesägt (**Abbildung 3-5**). Pro Rohr ergaben sich neun Schnitte. Der Boden dieser einzelnen Schichten wurde auf den Antibiotikagehalt untersucht.



Abbildung 3-5: Verlagerung von Antibiotika in Bodenschichten. Erhalt der Bodenproben durch Zersägen der Lysimeterrohre im Abstand von 5 cm.

3.7.1.4 Probenübersichten

Bodenschichten

Aus den jeweils neun Bodenschnitten der acht Lysimeterrohre ergaben sich insgesamt 72 einzelne Bodenproben. Diese wurden in Dreifachbestimmung aufgearbeitet und analysiert. Um eine Bilanzierung des Antibiotikaüberganges vornehmen zu können, wurden die einzelnen Böden ausgewogen (**Tabelle 3-14**).

Tabelle 3-14: Übersicht der Bodenschnitte und der darin enthaltenen Mengen an Boden, bezogen auf Frischmasse.

Säule	Boden [2,5 kg]	Antibiotikum	Konzentration pro Säule [µg/16 g Gülle]	Bodenschichten								
				1 [g]	2 [g]	3 [g]	4 [g]	5 [g]	6 [g]	7 [g]	8 [g]	9 [g]
7	Löß	CTC	1601,1	360	342	326	322	335	291	317	335	285
33	Sand	CTC	1601,1	297	293	273	320	311	315	297	318	302
13	Löß	DOX	1601,7	302	336	331	332	339	334	327	363	289
39	Sand	DOX	1601,7	315	308	303	299	301	307	292	295	330
19	Löß	SMX	1600,8	335	305	328	298	305	320	327	322	326
45	Sand	SMX	1600,8	323	301	385	287	301	303	291	305	326
25	Löß	SMZ	1602,5	278	342	329	340	329	333	346	351	302
51	Sand	SMZ	1602,5	275	274	307	299	308	312	314	321	290

Bodeneluat

Da die Analyten einzeln, in drei verschiedenen Konzentrationen und über zwei verschiedene Versuchsböden aufgegeben wurden, ergaben sich verschiedene Versuchsansätze (**Tabelle 3-15**). Jeder Ansatz wurde in Doppelbestimmung durchgeführt, sodass insgesamt 52 Lysimeterrohre benötigt wurden. Die Untersuchung der Bodeneluat wurde über einen Zeitraum von 24 Monaten vorgenommen. In diesen zwei Jahren ergaben sich insgesamt 4992 Proben. Um die Probenuntersuchung im Rahmen des Möglichen zu halten, wurde mit den Bodeneluaten der höchst dotierten Lysimeterrohre, mit einer aufgetragenen Antibiotikakonzentration von 100 mg kg^{-1} Gülle, begonnen. Zudem wurden jeweils vier Wochenproben zu einer „Monatsmischprobe“ vereint. Die untersuchten Säulen sind in **Tabelle 3-15** hervorgehoben.

Tabelle 3-15: Variantenübersicht der Lysimeterrohre (Säule 1 – 26: Lößboden; Säule 27 – 52: Sandboden).

Säule	Boden [2,5 kg]	Säule	Boden [2,5 kg]	Antibiotikum	Konzentration in Gülle [mg/kg]	Konzentration pro Säule [$\mu\text{g}/16 \text{ g Gülle}$]
1	Löß	27	Sand	ohne Zusatz	0	0
2	Löß	28	Sand	ohne Zusatz	0	0
3	Löß	29	Sand	CTC	20,13	322,1
4	Löß	30	Sand	CTC	20,13	322,1
5	Löß	31	Sand	CTC	50,09	801,5
6	Löß	32	Sand	CTC	50,09	801,5
7	Löß	33	Sand	CTC	100,07	1601,1
8	Löß	34	Sand	CTC	100,07	1601,1
9	Löß	35	Sand	DOX	20,00	320,0
10	Löß	36	Sand	DOX	20,00	320,0
11	Löß	37	Sand	DOX	50,11	801,7
12	Löß	38	Sand	DOX	50,11	801,7
13	Löß	39	Sand	DOX	100,11	1601,7
14	Löß	40	Sand	DOX	100,11	1601,7
15	Löß	41	Sand	SMX	20,16	322,5
16	Löß	42	Sand	SMX	20,16	322,5
17	Löß	43	Sand	SMX	50,05	800,8
18	Löß	44	Sand	SMX	50,05	800,8
19	Löß	45	Sand	SMX	100,05	1600,8
20	Löß	46	Sand	SMX	100,05	1600,8
21	Löß	47	Sand	SMZ	20,05	320,8
22	Löß	48	Sand	SMZ	20,05	320,8
23	Löß	49	Sand	SMZ	50,16	802,5
24	Löß	50	Sand	SMZ	50,16	802,5
25	Löß	51	Sand	SMZ	100,16	1602,5
26	Löß	52	Sand	SMZ	100,16	1602,5

3.8 Grundwasseruntersuchungen

Für die routinemäßige Bestimmung von Antibiotikarückständen in Grundwasserproben wurde eine LC-MS/MS-Methode entwickelt und validiert. Die Proben wurden im Rahmen des Grundwassermessprogrammes im Auftrag des HLNUG untersucht. Da bislang keine Rückstandshöchstmengen für Antibiotika im Grundwasser gesetzlich geregelt sind, legte der Auftraggeber das Erreichen einer Bestimmungsgrenze von 50 ng L^{-1} fest¹². Jährlich wurden insgesamt ca. 500 Grundwassermessstellen in Hessen beprobt und mittels der Methode auf ihren Antibiotikagehalt analysiert. Die Probenahme erfolgte in 50 mL lichtundurchlässigen Kunststoffgefäßen mit Schraubverschluss und begann am 01.01.2016. Die Proben wurden bis zu deren Analyse im Dunkeln bei $+4 \text{ °C}$ gelagert.

¹² Hierbei handelt es sich um den halben Wert im Vergleich zu Pflanzenschutzmitteln: Anlage 2 der GrwV regelt einen Schwellenwert für Wirkstoffe in Pflanzenschutzmitteln einschließlich der relevanten Metaboliten von $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ (GrwV, 2017).

3.9 Messmethode zur Bestimmung von Antibiotika in verschiedenen Umweltmatrices mittels UHPLC-MS/MS

3.9.1 Chromatographische Bedingungen

Die chromatographische Trennung der ausgewählten Tetracycline und Sulfonamide erfolgte über ein Ultra-High-Performance-Liquid-Chromatography-System (UHPLC) der Firma Waters. Für die Trennung wurde eine Raptor Biphenyl Säule der Firma Restek gewählt. Mit dieser Säule war im Vergleich zu modifizierten C-18 Säulen, wie beispielsweise der BEH oder Shield der Firma Waters, eine Trennung zwischen Chlortetracyclin und 4-Epi-Chlortetracyclin, sowie eine Trennung zwischen Iso-Chlortetracyclin und Epi-iso-Chlortetracyclin möglich. Für die chromatographische Trennung kam ein binäres Gradientensystem zum Einsatz. **Tabelle 3-16** fasst die chromatographischen Bedingungen zusammen. Diese konnten für die Analyse der zehn, im Rahmen dieser Arbeit, untersuchten Matrices verwendet werden.

Tabelle 3-16: Chromatographische Bedingungen.

Gerät	Acquity UHPLC-System der Firma Waters			
Trennsäule	Raptor Biphenyl 2,1 x 100 mm Säule mit einer Partikelgröße von 2,1 µm der Firma Restek oder eine vergleichbare Trennsäule			
Vorsäule	Raptor Biphenyl 5 x 2,1 mm; Partikelgröße 2,1 µm der Firma Restek oder eine vergleichbare Vorsäule			
Säulentemperatur	35 °C			
Injektionsvolumen	20 µL (angereicherte Proben) / 100 µL (direkt injizierte Proben)			
Eluent A	0,1 % Ameisensäure in Acetonitril			
Eluent B	0,1 % Ameisensäure in Wasser			
Gradient	Zeit [min]	Fluss [mL/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
	0	0,300	20	80
	2,00	0,300	20	80
	5,00	0,300	30	70
	7,00	0,300	50	50
	7,50	0,400	99	1
	8,50	0,400	99	1
	8,60	0,300	20	80
	10,00	0,300	20	80

3.9.2 Massenspektrometrische Bedingungen

Für die massenspektrometrische Detektion der Substanzen wurde ein Tandem-Massenspektrometer der Firma Waters verwendet. Um die optimalen massenspektrometrischen Bedingungen ermitteln zu können, musste die aktuelle Gerätekalibrierung mit den darin festgelegten Einstellungen für Ionenquelle und Analysator in die Tune-Page eingeladen werden (**Tabelle 3-17**). Zur Bestimmung der optimalen LC-MS/MS-Einstellungen wurde jeder Analyt anhand dessen Signalintensität „getuned“. Durch Variation der Cone-Spannung und Kollisions-Energien können in diesem Prozess die Empfindlichkeiten der einzelnen Substanzen gesteigert werden. Zum Tunen wurden Referenzstandards mit einer Analytkonzentration von 1 mg L⁻¹ in Methanol angesetzt und direkt in das Massenspektrometer injiziert. Über den MS Scan konnte das Mutterion gefunden, sowie dessen exakte Masse und Cone-Spannung eingestellt werden. Über den Tochter Scan wurden jeweils zwei Massenübergänge ermittelt und deren Kollisions-Energien optimiert (**Tabelle 3-18**).

Tabelle 3-17: Massenspektrometrische Bedingungen (beispielhaft).

Gerät	Triple-Quadrupol-Detektor der Firma Waters	
<u>Ionenquelle</u>	Modus	ESI (+)
	Capillary	1,05 kV
	Extractor	3,00 V
	RF Lens	0,3 V
	Source Temperature	130 °C
	Desolvation Temperature	450 °C
	Cone Gas Flow	60 L/Hr
	Desolvation Gas Flow	850 L/Hr
	Collision Gas Flow	0,20 – 0,25 mL/Min
<u>Analysator</u>	LM 1 Resolution*	5,10
	HM 1 Resolution*	14,70
	LM 2 Resolution*	12,20
	HM 2 Resolution*	15,00
	Ion Energy 1	0,40
	Ion Energy 2	1,40
	Collision Cell Pressure	3,0 – 4,0 · 10 ⁻³ mbar

* Bedingungen sind der aktuellen Gerätekalibrierung entsprechend anzupassen. Nach jeder Wartung ist die aktuelle Kalibrierung in die Tune-Page zu laden.

Tabelle 3-18: Massenübergänge und massenspektrometrische Einstellungen.

Analyt	Molare Masse [Da]	Quantifier (Q1) [Da]	Qualifier (Q2) [Da]	Cone [V]	Collision [eV]
(Epi)-Chlortetracyclin	479,17	444	154	36	20 (Q1) 44 (Q2)
(Epi)-Doxycyclin	445,23	428	154	34	20 (Q1) 28 (Q2)
(Epi)-iso-Chlortetracyclin	479,15	462	197	32	18 (Q1) 48 (Q2)
N-Acetyl-Sulfamethazin	321,15	134	186	46	28 (Q1) 20 (Q2)
N-Acetyl-Sulfamethoxazol	296,09	134	198	42	24 (Q1) 18 (Q2)
Sulfamethazin	279	186	92	38	18 (Q1) 26 (Q2)
Sulfamethoxazol	254,05	92	156	34	30 (Q1) 18 (Q2)
Demeclocyclin (1)	465,12	448	154	34	15 (Q1) 28 (Q2)
Sulfamethazin-phenyl- ¹³ C ₆ (2)	285	186	98	38	16 (Q1) 32 (Q2)
Sulfamethoxazol-phenyl- ¹³ C ₆ (3)	260,07	98	162	30	26 (Q1) 16 (Q2)

Tabelle 3-19: Fortführung der Tabelle 3-18.

Analyt	Dwell-Time [s]	Retentionszeit [min]	Quantifizierung über
(Epi)-Chlortetracyclin	0,006	4,28; (3,19: Epimer)	(1)
(Epi)-Doxycyclin	0,006	4,66	(1)
(Epi)-iso-Chlortetracyclin	0,006	2,58; (1,84: Epimer)	(1)
N-Acetyl-Sulfamethazin	0,006	2,70	(2)
N-Acetyl-Sulfamethoxazol	0,011	4,82	(3)
Sulfamethazin	0,006	3,05	(2)
Sulfamethoxazol	0,011	4,62	(3)
Demeclocyclin (1)	0,006	3,14	
Sulfamethazin-phenyl- ¹³ C ₆ (2)	0,006	3,05	
Sulfamethoxazol-phenyl- ¹³ C ₆ (3)	0,011	4,62	

3.9.3 Identifizierung und Quantifizierung der Analyte / Datenauswertung

Alle Messungen wurden über die Software MassLynx Version 4.1 (Waters) vorgenommen und ausgewertet. Die Messung der Analyte erfolgte im Multiple Reaction Monitoring Mode (MRM).

Die Quantifizierung der Analyten wurde über Matrixkalibrierungen mit internem Standardzusatz vorgenommen. Zur Erstellung einer Kalibrierfunktion wurde der Response gegen die Konzentration aufgetragen. Bei dem Response handelt es sich um das Verhältnis der Analyt-Peakfläche des ersten Überganges zu der Peakfläche des jeweiligen internen Standards.

Zur Identifizierung einer Substanz wurden die jeweiligen Retentionszeiten resultierend aus der zeitlichen chromatographischen Trennung, sowie das Ion Ratio herangezogen. Das Ion Ratio setzt sich aus dem Verhältnis zwischen der Analyt-Peakfläche des ersten Überganges zu der Analyt-Peakfläche des zweiten Überganges zusammen und ist charakteristisch für jede Substanz. Zur Identifizierung eines Analyten und Absicherung von Positivbefunden wurde das Ion Ratio der Probenlösung mit dem der Matrixkalibrierung verglichen¹³.

Die Angabe der Tetracyclinegehalte erfolgte als Summe aus der Ursprungssubstanz und dessen Epimer.

¹³ Der Analyt in der Probe musste die gleiche Retentionszeit ($\pm 5\%$) und das gleiche Ion-Ratio ($\pm 20\%$) wie der Analyt in der Kalibrierung aufweisen (Toleranzen in Anlehnung an Zhou et al. 2012).

3.10 Entwicklung und Optimierung der Probenvorbereitungsmethode für feststoffreiche Umweltproben anhand von Rindergülle

Im ersten Schritt der Probenvorbereitung müssen die nachzuweisenden Analyte möglichst quantitativ aus der Probenmatrix herausgelöst werden. Hierzu wird das Probenmaterial mit einem geeigneten Extraktionsmittel extrahiert. Die durchgeführten Entwicklungs- und Optimierungsschritte der **Fest-Flüssig-Extraktion** in Bezug auf die Wahl eines geeigneten Extraktionsmittels und geeigneter Extraktionsbedingungen sind in **Abbildung 3-6** zusammengestellt.

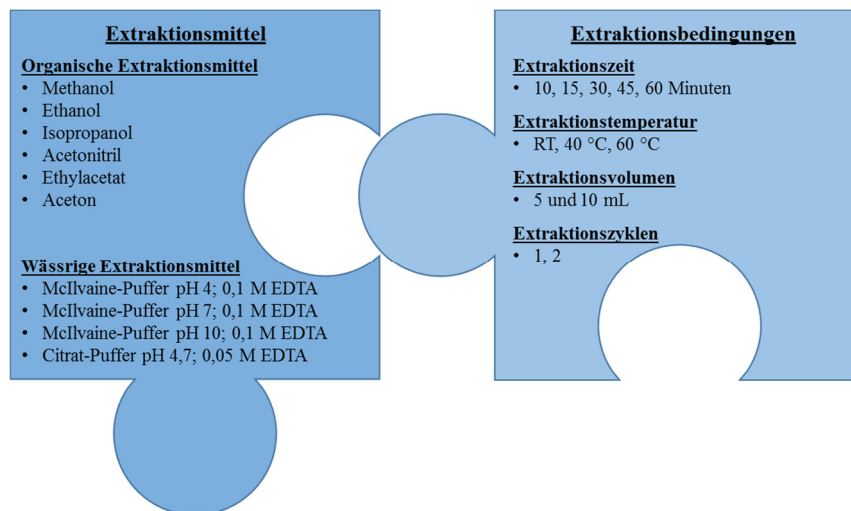


Abbildung 3-6: Entwicklungs- und Optimierungsschritte der Fest-Flüssig-Extraktion.

Die Aufarbeitung besonders matrixreicher Proben wie Rindergülle, Weidelgras und Möhren umfasst zudem häufig den Probenvorbereitungsschritt der **Festphasenextraktion (SPE – Solid-Phase-Extraktion)**. Die SPE dient der Aufreinigung des Probenextraktes und der Anreicherung der Analyte in der Probe über eine feste Phase. Hierdurch können niedrigere Bestimmungsgrenzen erzielt werden. Durchgeführte Entwicklungs- und Optimierungsschritte der SPE fasst **Abbildung 3-7** zusammen.

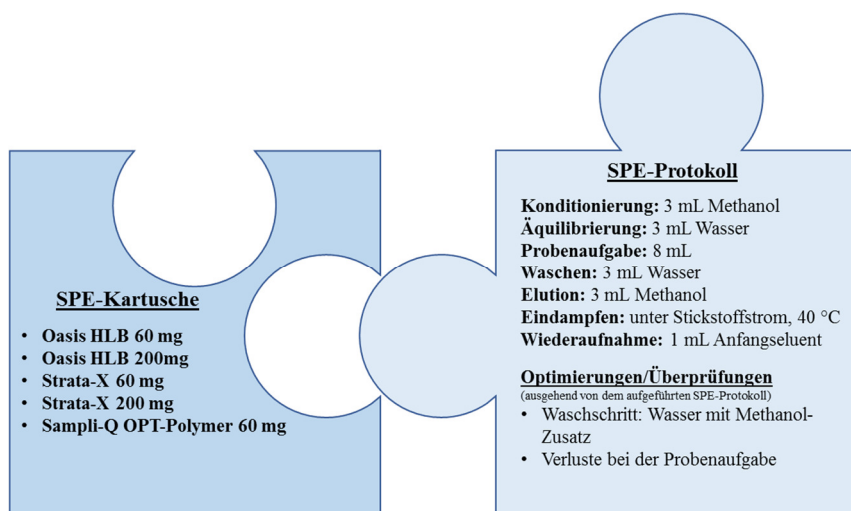


Abbildung 3-7: Entwicklungs- und Optimierungsschritte der Festphasenextraktion.

3.10.1 Fest-Flüssig-Extraktion

Zur Bestimmung von Antibiotikarückständen aus feststoffreichen Matrices ist zunächst deren Überführung in ein flüssiges Medium notwendig. Hierzu ist eine Fest-Flüssig-Extraktion die Probenaufarbeitungsmethode der Wahl. Extraktionsversuche wurden mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln und wässrigen Puffern durchgeführt. Bei der Wahl der organischen Lösungsmittel wurde sich an der elutropen Reihe orientiert. Hierbei wurde versucht auf besonders toxische oder kanzerogene Lösungsmittel wie Dichlormethan und Hexan, wenn möglich, zu verzichten. Als Puffer wurden McIlvaine-Puffer und Citratpuffer getestet. Diese beiden Puffersysteme werden insbesondere im Zusammenhang mit der Tetracyclinanalytik überwiegend in der Literatur beschrieben. Häufig erfolgt zudem die Zugabe von EDTA. Sowohl Citronensäure als auch EDTA sind Komplexbildner. Die Komplexierung von Tetracyclinen an mehrwertigen Kationen soll über deren Zusatz vermieden bzw. verringert werden (Berendsen et al., 2015; Oka et al., 2000).

3.10.1.1 Wahl des geeigneten Extraktionsmittels

Organische Lösungsmittel

Zu den getesteten organischen Lösungsmitteln zählten Methanol, Ethanol, Isopropanol, Acetonitril, Ethylacetat und Aceton. Da kein geeignetes zertifiziertes Referenzmaterial zur Verfügung stand, wurden die Optimierungsversuche mit analytfreier Rindergülle vom LHL Eichhof durchgeführt. Diese wurde mit den Zielanalyten angereichert. Hierzu wurde 0,5 g Gülle in ein 15 mL PP-Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 50 µL eines Antibiotika-Mischstandards (Standard V, **Tabelle 3-7**) bestehend aus Chlortetracyclin, iso-Chlortetracyclin, Doxycyclin, Sulfamethazin, Sulfamethoxazol, *N*-Acetyl-Sulfamethazin und *N*-Acetyl-Sulfamethoxazol dotiert. Die Antibiotikakonzentration in der Gülle betrug nach der Dotierung für jedes Antibiotikum 10 mg kg⁻¹. Die dotierten Proben wurden eine Stunde im Kühlschrank bei + 5 °C einwirken lassen, um eine Wechselwirkung der Analyte mit der Matrix zu gewährleisten. Im Anschluss wurden 5 mL des jeweiligen Extraktionsmittels zugegeben und die Probenmischung für eine Minute über einen Vortexmischer homogenisiert. Die Extraktion erfolgte für 15 Minuten über eine Labor-Schüttelmaschine bei Raumtemperatur. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 5000 x g wurde ein Aliquot des Überstandes abgenommen und über einen 0,2 µm Membranfilter filtriert. Der filtrierte Extrakt wurde 1:50 mit Anfangseluent der LC (Acetonitril/Wassergemisch (20:80; v/v) mit 0,1 % Ameisensäure) verdünnt und mittels UHPLC-MS/MS gemessen. Die Wiederfindungen wurden gegen eine Lösungsmittelkalibrierung im Konzentrationsbereich von 1 bis 50 mg kg⁻¹ bestimmt.

Wässrige Citrat-Phosphat-Puffersysteme

Für die Extraktionstests mit Citrat-Phosphat-Puffersystemen wurden die gleichen Extraktionsbedingungen gewählt wie für die organischen Lösungsmittel. Die Extraktion wurde mit McIlvaine-Puffer pH 4, pH 7 und pH 10 mit jeweils 0,1 M EDTA durchgeführt. Als weiteres Extraktionsmittel wurde Citratpuffer pH 4,7 mit 0,05 M EDTA getestet.

3.10.1.2 Optimierung der Extraktionsbedingungen

Extraktionstemperatur

Zur Durchführung von Extraktionen bei höheren Temperaturen als Raumtemperatur wurde ein beheizbares und mit Thermostat ausgestattetes Ultraschallbad verwendet. Die Extraktionen wurden unter Anwendung von Ultraschall bei 40 °C und 60 °C durchgeführt und mit der Extraktion bei Raumtemperatur über eine Labor-Schüttelmaschine verglichen. Die Extraktionszeit betrug 15 Minuten. Als Extraktionsmittel wurden McIlvaine-Puffer verschiedener pH-Werte getestet.

Extraktionszeit

Zur Prüfung ob eine weitere Steigerung der Extraktionsausbeuten mit der Zunahme der Extraktionsdauer korreliert, wurden verschiedene Extraktionszeiten getestet (10, 15, 30, 45, 60 Min.).

Extraktionszyklen

Nach der Extraktion wurde der Extraktionsüberstand abdekantiert. Der Extraktionsrückstand wurde erneut mit 5 mL McIlvaine-Puffer pH 4 extrahiert. Die Extraktionsüberstände aus der ersten und zweiten Extraktion wurden vereint.

EDTA-Zusatz

Neben einer EDTA-Konzentration von 0,1 M wurde ebenfalls eine Konzentration von 0,05 M getestet.

3.10.2 Festphasenextraktion

3.10.2.1 Auswahl der geeigneten SPE-Kartusche

Bei den Zielanalyten handelt es sich um zwei verschiedene Wirkstoffgruppen. Diese unterscheiden sich in ihren chemischen Eigenschaften (**Kapitel 1.8, 1.9** und **5**). Um eine Multimehode zu entwickeln wurden daher SPE-Materialien zum Test ausgewählt, die sowohl das Anreichern saurer, neutraler und basischer Komponenten erlauben. Zudem wurden aufgrund des hohen Wasseranteils des Probenextraktes Umkehrphasenmaterialien gewählt. Zum Test wurden drei Kartuschen (Oasis-HLB, Strata-X, SampliQ-OPT) von verschiedenen Herstellern herangezogen (**Tabelle 3-2**).

3.10.2.2 Screening ohne Gülle-Zusatz

Die „Vor“-Auswahl der SPE-Kartuschen wurde anhand matrixfreier Antibiotikastandards vorgenommen. Hierzu wurden 50 µL Standard IV (**Tabelle 3-7**) (dies entspräche bei einer Proben einwaage von 0,5 g einer Konzentration von 50 µg kg⁻¹) und 20 µL ISTD 2 (**Tabelle 3-9**) in ein 15 mL PP-Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Im Anschluss daran wurden 10 mL McIlvaine-Puffer pH 4 mit einem EDTA-Zusatz von 0,05 M zugegeben. Die Probe wurde verschlossen, über einen Vortexmischer homogenisiert und für 15 Minuten in einem 40 °C warmen Ultraschallbad

extrahiert. Der komplette Extrakt wurde über die jeweilige SPE-Kartusche gegeben. Diese wurde zuvor mit 3 mL Methanol, gefolgt von 3 mL Wasser konditioniert. Der Waschschrift wurde im Anschluss mit 3 mL Wasser durchgeführt und die Elution der Analyte von der Kartusche erfolgte mit 3 mL Methanol. Das Eluat wurde in einem Probenkonzentrator unter einem Stickstoffstrom bei 40 °C bis zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde in 1 mL eines Acetonitril/Wasser-Gemisches (20:80; v/v + 0,1 % Ameisensäure) gelöst, über einen 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter membranfiltriert und ein Aliquot von 20 µL in das LC-MS/MS-System injiziert. Alle Ansätze wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Wiederfindungen wurden gegen einen direktinjizierten Lösungsmittelstandard der gleichen Analytkonzentration gemessen und auf zwei verschiedene Arten ausgewertet. Um Verluste durch den SPE-Probenaufarbeitungsschritt zu erfassen, wurden die Wiederfindungen auf die Analyt-Peakflächen bezogen (**Gl. 3-1**). Unter Einbeziehung des Verhältnisses der Analyt-Peakfläche zu der Peakfläche des internen Standards (Response) wurden ebenfalls Wiederfindungen berechnet (**Gl. 3-2**). Diese sollten zeigen, ob der interne Standard in gleichem Maße durch die Aufarbeitung beeinflusst wird wie der Analyt, welcher über diesen quantifiziert wird.

$$\text{WDF}_{\text{flächenbezogen}} [\%] = \frac{\text{Fläche}_{\text{Analyt nach SPE}}}{\text{Fläche}_{\text{Analyt in der Referenz}}} \cdot 100 \quad (\text{Gl. 3-1})$$

$$\text{WDF}_{\text{responsebezogen}} [\%] = \frac{\text{Response}_{\text{Analyt nach SPE}}}{\text{Response}_{\text{Analyt in der Referenz}}} \cdot 100 \quad (\text{Gl. 3-2})$$

3.10.2.3 Screening mit Gülle-Zusatz

Für das Screening mit Gülle wurde 0,5 g analytfreie Rindergülle in ein 15 mL PP-Zentrifugenröhrchen eingewogen. Anschließend wurden 50 µL Standard IV (**Tabelle 3-7**) und 20 µL ISTD 2 (**Tabelle 3-9**) dotiert. Die Antibiotikakonzentration in der Probe betrug somit je Analyt 50 µg kg⁻¹. Die Proben wurden für eine Stunde im Kühlschrank bei + 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 mL McIlvaine-Puffer pH 4 mit 0,05 M EDTA-Zusatz und das Probengefäß wurde verschlossen. Das Extraktionsgemisch wurde unter Zuhilfenahme eines Vortexmischers für 1 Minute homogenisiert und anschließend für 15 Minuten bei 40 °C im Ultraschallbad extrahiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 5000 x g wurde der Überstand abdekantiert und der Rückstand unter den gleichen Extraktionsbedingungen erneut extrahiert. Die Überstände wurden vereint, mittels Vortexmischer homogenisiert und 8 mL des Probenextraktes über die SPE-Kartuschen gegeben. Die SPE-Bedingungen wurden wie bei dem Screening ohne Güllezusatz beibehalten (**Kapitel 3.10.2.2**). Nach dem Einengen des Eluates bis zur Trockene bei 40 °C im Stickstoff-Probenkonzentrator wurde der Rückstand in 1 mL eines Acetonitril/Wasser-Gemisches (20:80; v/v mit 0,1 % Ameisensäure) gelöst, membranfiltriert und ein Aliquot von 20 µL in das LC-MS/MS-System injiziert. Die Wiederfindungen wurden über einen Peakflächen- und Responsevergleich gegen einen direkt injizierten Lösungsmittelstandard der gleichen Analytkonzentration nach **Gl. 3-1** und **Gl. 3-2** bestimmt.

3.10.3 Übertragung der optimierten Probenaufarbeitungsmethode auf weitere Matrices

Zur Bestimmung von Antibiotika in Bodenproben musste die entwickelte Probenaufarbeitungsmethode abgewandelt werden. Mischungen von McIlvaine-Puffer (mit 0,05 M EDTA-Zusatz) unterschiedlicher pH-Werte (pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8) und Methanol wurden als Extraktionsmittel getestet. Hierzu wurde 1 g Boden in ein 15 mL PP-Zentrifugenröhrchen eingewogen. Anschließend wurde dieser mit 100 μL Standard IV (**Tabelle 3-7**) und 20 μL ISTD 2 (**Tabelle 3-9**) dotiert. Die Antibiotikakonzentration in der Probe betrug somit je Analyt 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Um eine Wechselwirkung der Analyten mit dem Bodenmaterial zu ermöglichen, wurde das Probengefäß für 30 Minuten im Kühlschrank bei + 5 °C aufbewahrt (Liu et al., 2017; Allaire et al., 2006). Danach wurden 1 mL Puffer und 5 mL Methanol zugegeben. Die Probe wurde verschlossen, mittels Vortexmischer homogenisiert und in einem Ultraschallbad für 15 Minuten bei 40 °C extrahiert. Im Anschluss wurde die Probe für 10 Minuten bei 5000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das Methanol im Probenkonzentrator bei 40 °C unter Stickstoffzufuhr abgedampft. Der Extraktionsrückstand wurde über einen 0,2 μm Membranfilter in ein Messvial überführt und ein Aliquot von 20 μL direkt in das LC-MS/MS-System injiziert. Auf die SPE-Anreicherung wurde verzichtet.

3.10.4 Optimierte Versuchsvorschriften zur Probenaufarbeitung

Nach durchgeführter Optimierungen sind im Folgenden die Versuchsvorschriften zur Aufarbeitung verschiedener Umweltmatrices für den simultanen Nachweis von Tetracyclin- und Sulfonamid-Rückständen aufgeführt. Eine Übersicht ist in **Abbildung 3-8** gegeben. Die Methoden sind für den Nachweis von (Epi)-Chlortetracyclin, (Epi)-Doxycyclin, (Epi)-iso-Chlortetracyclin, Sulfamethazin, Sulfamethoxazol, *N*-Acetyl-Sulfamethazin und *N*-Acetyl-Sulfamethoxazol geeignet und validiert (vgl. **Kapitel 4.2**). Zur Quantifizierung wurde eine Matrixkalibrierung mit internem Standard verwendet. Die Kalibrierung wurde gleichermaßen wie die Proben aufgearbeitet.

3.10.4.1 Versuchsvorschrift für Gülle, Weidelgras und Möhren

Als geeignetes Extraktionsmittel zur simultanen Erfassung von Tetracyclinen und Sulfonamiden wurde McIlvaine-Puffer pH 4 mit einem 0,05 M EDTA-Zusatz gewählt. Je nach Matrix und der zur Verfügung stehenden Probenmenge wurden 0,5 g bis 1 g der homogenisierten Probe in ein 15 mL PP-Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 20 μL des internen Standardgemisches ISTD 2 (**Tabelle 3-9**) versetzt. Die Probe wurde mit Hilfe eines Vortexmischers homogenisiert. Nach einer Einwirkzeit von 30 Minuten bei 5 °C, wurden 5 mL des Extraktionsmittels zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde verschlossen und eine Minute unter Zuhilfenahme eines Vortexmischers durchmischt. Die Extraktion erfolgte in einem mit Thermostat ausgestatteten Ultraschallbad bei 40 °C. Die Extraktionsdauer betrug 15 Minuten. Nach erfolgter Extraktion wurden die Proben für eine Minute geschüttelt und im Anschluss für 10 Minuten

bei 5 °C und 5000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein zweites 15 mL PP-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 5 °C im Kühlschrank gelagert. Der Extraktionsrückstand wurde ein weiteres Mal unter den gleichen Bedingungen extrahiert. Die beiden Überstände wurden vereint. Ein 8 mL-Aliquot des Extraktionsüberstandes wurde zur Festphasenextraktion eingesetzt. Die Anreicherung erfolgte über Strata-X-Kartuschen der Firma Phenomenex mit einer Sorbentmenge von 60 mg. Das Festphasenmaterial wurde mit 3 mL Methanol konditioniert und im Anschluss mit 3 mL Wasser äquilibriert. Nach erfolgter Probenaufgabe wurde die Festphase mit 1 mL Wasser gewaschen und für ca. 5 Minuten unter Anlegen von Vakuum trocken gesaugt. Die Elution der Analyte von dem Sorbentmaterial erfolgte mit 3 mL Methanol. Das Eluat wurde im Stickstoff-Probenkonzentrator bei 40 °C bis zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde je nach Matrix in 500 µL bzw. 1000 µL Anfangseluent der LC (Acetonitril/Wasser-Gemisch (20:80; v/v) mit 0,1 % Ameisensäure) gelöst. Im Anschluss daran wurde der Probenextrakt über 0,2 µm Membranfilter in ein PP-Messvial überführt und mittels UHPLC-MS/MS analysiert.

Proben mit einem erwartungsgemäß hohen Antibiotikagehalt (in der vorliegenden Arbeit Gülleproben im dotierten mg kg⁻¹-Bereich) wurden mit 50 µL ISTD 1 (**Tabelle 3-9**) versetzt und nach der Extraktion im Ultraschallbad mit Anfangseluent (Acetonitril/Wasser-Gemisch (20:80; v/v) mit 0,1 % Ameisensäure) um den Faktor 100 verdünnt. Der verdünnte Probenextrakt wurde direkt zur Analyse eingesetzt. Der Schritt der Festphasenextraktion wurde ausgelassen.

3.10.4.2 Versuchsvorschrift für Boden (Volkmarser Sand und Baunataler Löß)

Die Methode wurde sowohl zur Untersuchung von Bodenproben der beiden Aufwüchse (Weidelgras und Möhren), als auch zur Untersuchung von Bodenproben aus den Lysimeterrohren herangezogen. Bei der Extraktion von Bodenproben war der Zusatz von Lösungsmitteln unumgänglich. Als geeignetes Extraktionsmittelgemisch zum simultanen Nachweis von Tetracyclinen und Sulfonamiden in Bodenproben, erwies sich eine Mischung aus McIlvaine-Puffer pH 6 mit einem 0,05 M EDTA-Zusatz und Methanol. Die Bodenproben wurden durch händisches Durchkneten des Probenbeutels homogenisiert und anschließend vollständig in eine Aluschale überführt. Die Probe wurde in sechs gleiche Teile unterteilt. Aus jedem dieser Teile wurde ein Aliquot entnommen und zu einer Mischprobe von ca. 1 g in einem 15 mL PP-Zentrifugenröhrchen vereint. Im Anschluss wurden 20 µL des ISTD 2 (**Tabelle 3-9**) dotiert und mittels Vortexmischer homogen in der Probe verteilt. Nach 30-minütiger Einwirkzeit im Kühlschrank erfolgte die Zugabe von 1 mL McIlvaine-Puffer pH 6 mit 0,05 M EDTA-Zusatz. Die Probe wurde über einen Vortexmischer homogen im Extraktionsmittel verteilt. Anschließend wurden 5 mL Methanol zugegeben, das Probengefäß verschlossen und erneut mittels Vortexmischer durchmischt. Die Extraktion erfolgte für 5 Minuten im Ultraschallbad bei 60 °C. Nach erfolgter Extraktion wurden die Proben für eine Minute durchmischt und danach für 10 Minuten bei 5 °C und 5000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und das Methanol im Stickstoff-Probenkonzentrator bei 40 °C abgedampft.

Der wässrige Pufferrückstand wurde zum vollständigen Lösen aller Antibiotika 1 Minute mittels Vortexmischer geschüttelt und über einen 0,2 µm Membranfilter in ein PP-Messvial überführt. Die Messung erfolgte mittels UHPLC-MS/MS. Der Schritt der Festphasenextraktion wurde ausgelassen.

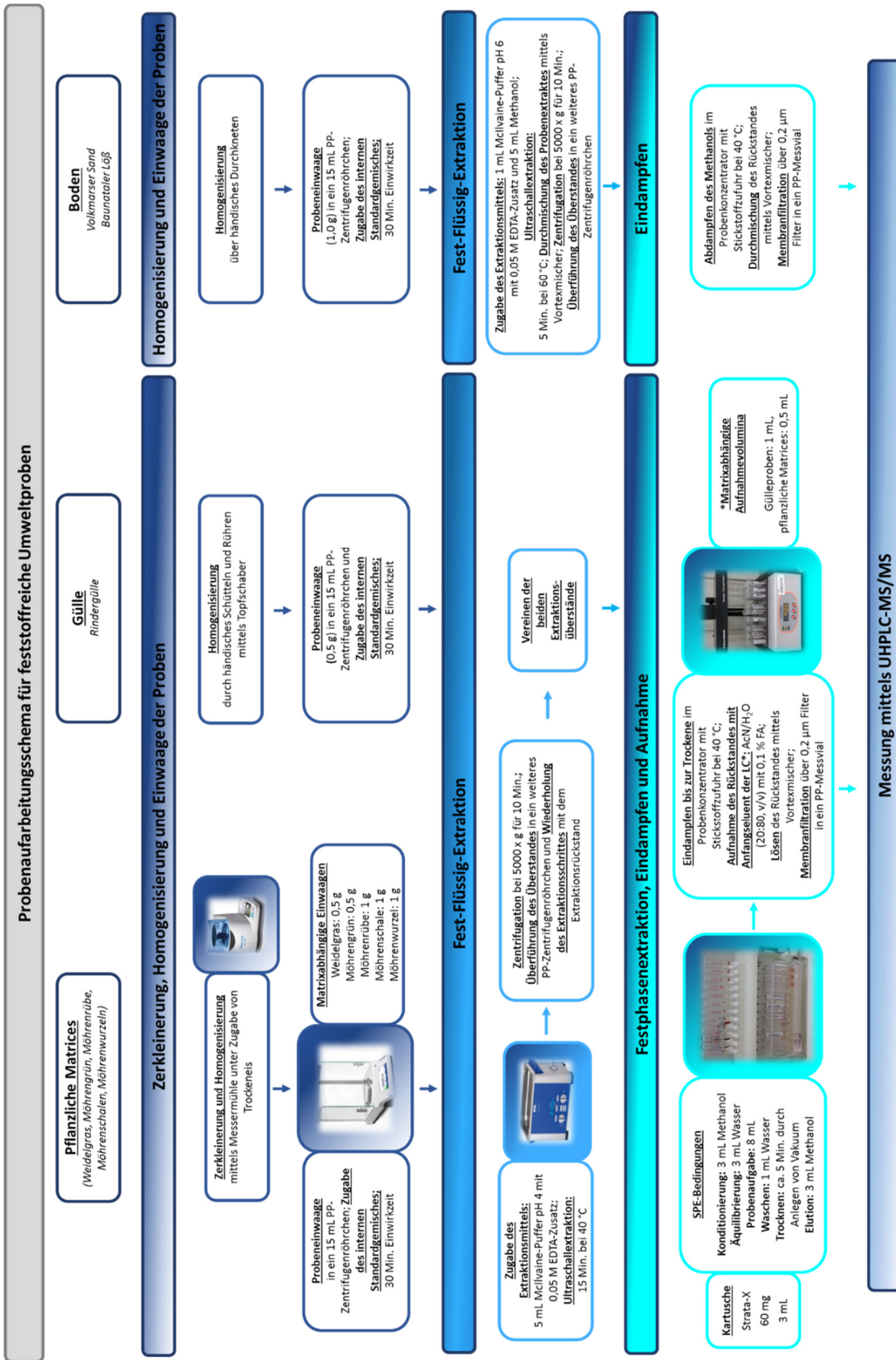


Abbildung 3-8: Schematische Übersicht zur Probenaufarbeitung feststoffreicher Umweltproben.

3.11 Entwicklung und Optimierung der Probenvorbereitungsmethode für Wasserproben

3.11.1 Bestimmung von Antibiotika im Grundwasser

Probenaufarbeitungsmethode - Direktinjektionsverfahren

Von Seiten des Auftraggebers, dem HLNUG, war die Erreichung einer Bestimmungsgrenze von 50 ng L^{-1} je Analyt vorgegeben. Da derzeit keine gesetzlichen Regelungen zu Rückstandshöchstmengen von Antibiotika im Grundwasser existieren, wurde sich bei der Methodenentwicklung an dieser Bestimmungsgrenze orientiert. Für die Probenaufarbeitung wurden ca. 2 mL der Grundwasserprobe über einen $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ Membranfilter filtriert. Exakt 1 mL der filtrierten Probenlösung wurde in ein lichtundurchlässiges PP-Messvial pipettiert. Die Probe wurde mit $20 \text{ }\mu\text{L}$ ISTD 3 (**Tabelle 3-9**) versetzt, durchmischt und direkt zur Messung eingesetzt. Für alle geforderten Analyte (Chlortetracyclin, Doxycyclin, Sulfamethazin und Sulfamethoxazol) konnte die Bestimmungsgrenze von 50 ng L^{-1} erreicht werden. Das Injektionsvolumen betrug $100 \text{ }\mu\text{L}$. Die Messmethode wurde zudem um Hauptmetabolite und Transformationsprodukte erweitert. Hierzu zählten *N*-Acetyl-Sulfamethazin, *N*-Acetyl-Sulfamethoxazol und iso-Chlortetracyclin. Auch für diese Substanzen konnte die geforderte Bestimmungsgrenze von 50 ng L^{-1} erzielt werden. Die Validierungskenndaten sind in **Tabelle 4-13** zusammenfassend aufgeführt.

3.11.2 Bestimmung von Antibiotika in Bodeneluaten aus Lysimeterstudien

Probenaufarbeitungsmethode - Anreicherungsverfahren

Mit einem automatisierten Festphasen-Extraktionssystem (**Tabelle 3-1**) konnte die Bestimmungsgrenze, verglichen mit dem Direktinjektionsverfahren, von 50 ng L^{-1} auf 1 ng L^{-1} abgesenkt werden. Zur Erreichung dieser Bestimmungsgrenze war ein Anreichervolumen von $\geq 100 \text{ mL}$ erforderlich. Neben den Proben wurden auch die Kalibrier- und Qualitätskontrollstandards über Festphasenextraktion angereichert. Das Festphasensystem bietet Platz für 6 parallele Aufarbeitungen. Um eine Verschmutzung und Verstopfung der Schläuche durch Bodenpartikel aus den Bodeneluaten zu vermeiden, wurden besonders matrixreiche Lysimetereluat vor deren Anreicherung filtriert. Dies erfolgte über eine Nutsche mit $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ Papierfilter. Anschließend wurden je vier Wochenproben zu einer „Monats-Mischprobe“ vereint. Das Probenvolumen der einzelnen Mischproben variierte je nach durchgelaufener Eluatmenge und betrug zwischen 150 und 210 mL. Das genaue Eluatvolumen wurde notiert, um eine spätere Bilanzierung vornehmen zu können. Die Probe wurde mit 5 % McIlvaine-Puffer (pH 4; 0,1 M EDTA-Zusatz) und $20 \text{ }\mu\text{L}$ ISTD 2 (**Tabelle 3-9**) versetzt. Die Proben wurden im Ultraschallbad für 10 Minuten homogenisiert und über Strata-X-Kartuschen automatisiert angereichert. Das Volumen wurde so gewählt, dass das gesamte Probenvolumen einer Monatsmischprobe angereichert wurde. Die Vorbereitung der Extraktionskartuschen (Konditionierung, Äquilibrierung, Waschen, sowie die Elution) waren hierbei analog zu der Aufarbeitung feststoffreicher Proben (**Kapitel 3.10.4.1**). Das Eluat der Festphasenextraktion wurde über einen Stickstoff-Probenkonzentrator bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Trockene eingengt. Der Extraktionsrückstand wurde in $300 \text{ }\mu\text{L}$

Eluentengemisch (Acetonitril/Wasser, 20/80 mit 0,1 % Ameisensäure) aufgenommen, gelöst und über 0,2 µm Membranfilter in ein lichtundurchlässiges PP-Messvial überführt. Um Verschleppungen der einzelnen Antibiotika im automatisierten Anreicherungssystem („AutoTrace“) zu vermeiden, wurde nach jedem Lauf eine Spülmethode geladen und die Schläuche somit gesäubert. Die Anreicherungs- und Spülmethode wurde über die Software Dionex geschrieben und auf das AutoTrace-System geladen.

Abbildung 3-9 fasst die Probenaufarbeitungen von Wasserproben über Direktinjektion und Anreicherung zusammen. Die Validierungskenndaten sind in **Tabelle 4-12** aufgeführt.

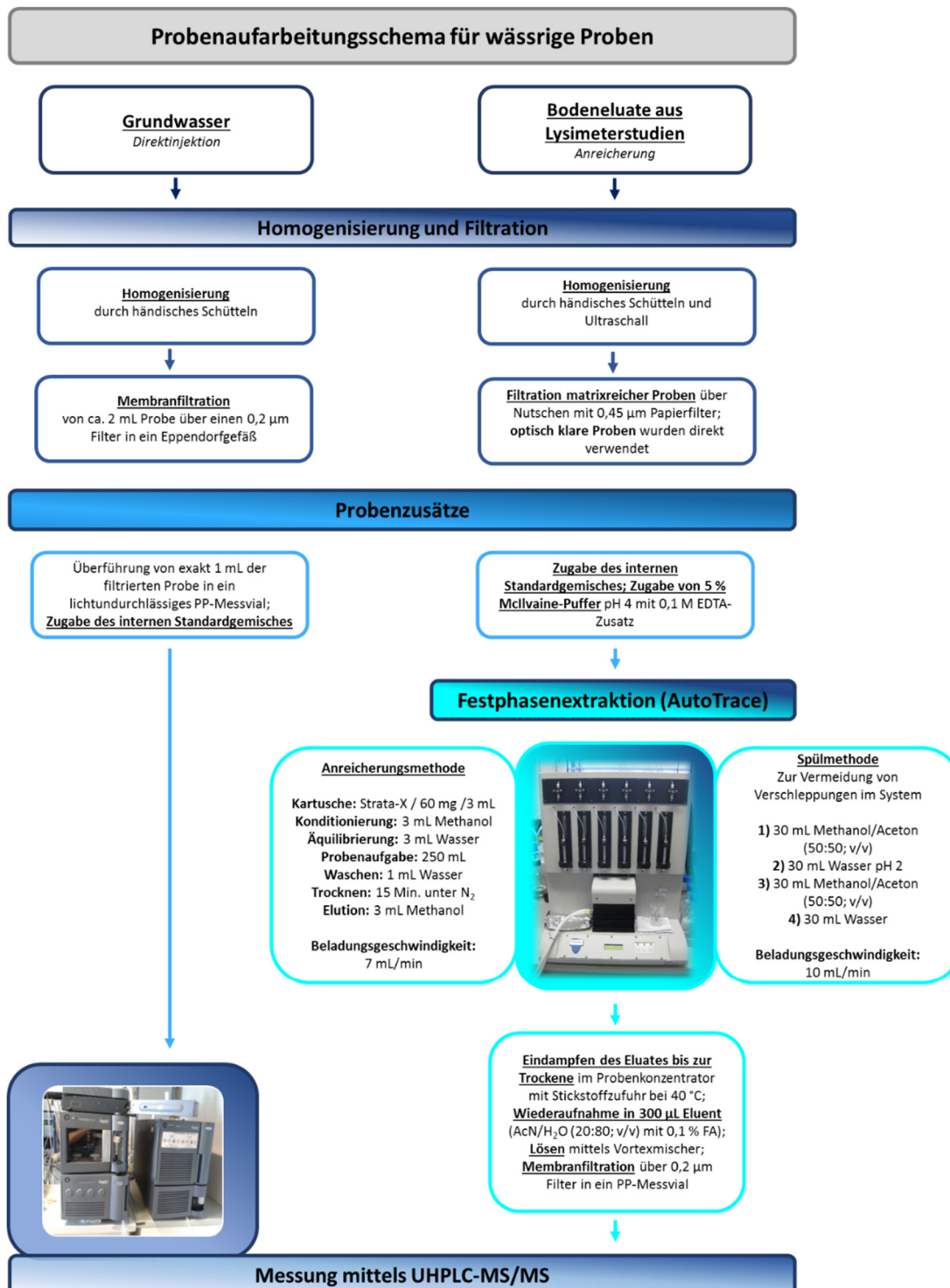


Abbildung 3-9: Schematische Übersicht zur Probenaufarbeitung wässriger Umweltproben.

3.12 Validierung der entwickelten Analysemethoden

Die Validierung der Methoden wurde für jede in der vorliegenden Arbeit verwendete Matrix vorgenommen. Sie umfasste – gemäß den internen Laborbestimmungen des Landesbetriebes Hessisches Landeslabor (Standardarbeitsanweisungen) – die folgenden Parameter:

- Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen
- Wiederfindungen
- Linearität der Kalibrierfunktion (Arbeitsbereich)
- Präzision (intraday und interday)
- Messunsicherheitsabschätzung
- Richtigkeit (Ringversuche)

Die erhobenen Validierungskenndaten sind im **Kapitel 4.2** „Verfahrenskenndaten“ tabellarisch zusammengestellt.

3.12.1 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen wurden für jeden Analyten gemäß DIN 32645:2008-11 nach dem Kalibrierwertverfahren ermittelt und berechnet (DIN 32645:2008-11, 2008). Hierzu wurde eine Matrix-Kalibrierfunktion in Dreifachbestimmung über eine Dekade (10-äquidistante Punkte) im Bereich um die erwartete Bestimmungsgrenze aufgenommen. Der Quotient aus der Analyt-Peakfläche des ersten Überganges zu der Peakfläche des internen Standards (= Response) wurde gegen die Konzentration aufgetragen. Eine Absicherung der über dieses Verfahren erhaltenen Bestimmungsgrenzen erfolgte über eine zehnfach-Aufarbeitung auf diesem Konzentrationsniveau (siehe 3.12.2). **Abbildung 3-10** zeigt beispielhaft eine Kalibrierfunktion für Doxycyclin über eine Dekade.

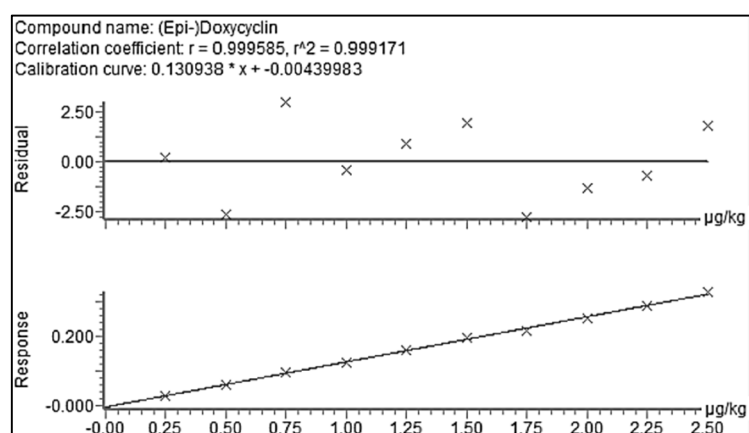


Abbildung 3-10: Beispielhafte Matrixkalibrierfunktion über eine Dekade zur Ermittlung der Bestimmungsgrenzen für Doxycyclin in Möhrenrüben. Screenshot der Auswertesoftware TargetLynx der Firma Waters.

3.12.2 Wiederfindungen

Die Wiederfindungsrate wurde an dotierten Leerproben (analytffreie Matrix) bestimmt. Diese wurden zehnfach, auf drei verschiedenen Dotierniveaus über den gesamten Arbeitsbereich (auf der Bestimmungsgrenze, auf dem mittleren Kalibrierniveau und auf dem höchsten Kalibrierniveau) aufgearbeitet. Die Wiederfindungsrate wurde gegen eine Matrixkalibrierung bestimmt. Der Quotient aus dem gemessenen Mittelwert und der zugesetzten Konzentration, multipliziert mit 100, ergibt die Wiederfindungsrate WDF in % (**Gl. 3-3**). Gemäß dem intern gesetzten Qualitätsziel sollten die Wiederfindungsraten zwischen 70 % und 120 % betragen, in Anlehnung an die Vorgaben für Pestizide (European Commission, 2016).

$$\text{WDF} = \frac{\bar{x}}{x_R} \cdot 100 \% \quad (\text{Gl. 3-3})$$

mit:

\bar{x} gemessener Mittelwert

x_R richtiger Wert

Mit Hilfe des Grubbs-Tests (**Gl. 3.4**) wurde auf mögliche Ausreißer überprüft.

$$Q = \frac{|x_1 - \bar{x}|}{s} \quad (\text{Gl. 3-4})$$

mit:

x_1 ausreißerverdächtigter Wert

\bar{x} Mittelwert

s Standardabweichung

3.12.3 Linearität über den Arbeitsbereich

Die Quantifizierung der Analyte in verschiedenen Umweltproben erfolgte über Matrixkalibrierfunktionen. Voraussetzung hierfür sind Kalibrierfunktionen die über den beschriebenen Arbeitsbereich Linearität aufweisen. Für die Aufnahme einer Kalibrierfunktion wurden mindestens sechs Dotierniveaus und der Blindwert herangezogen. Über die Auswertesoftware Target-Lynx der Firma Waters wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Der Regressionskoeffizient R^2 dient als Maß für die Güte der Kalibrierung und betrug für jeden Zielanalyten $\geq 0,99$. Neben der Regressionsanalyse führt die Software eine Residualanalyse durch. Über diese werden die prozentualen Abweichungen zwischen der durch die Kalibriergerade berechneten Konzentration zu der tatsächlich ermittelten Konzentration (Messwert) dargestellt (**Abbildung 3-11**). Die Residuen sollten nicht mehr als $\pm 10 \%$ von der Regressionsgeraden der Kalibrierfunktion abweichen.

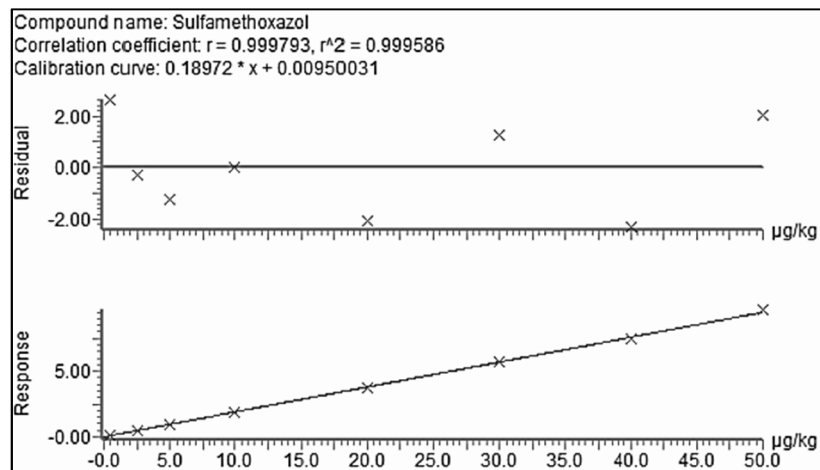


Abbildung 3-11: Beispielhafte Matrixkalibrierfunktion zur Bestimmung von Sulfamethoxazol in Möhrenrüben. Screenshot der Auswertesoftware TargetLynx der Firma Waters mit den Ergebnissen der Regressions- und Residualanalyse.

Zur Überprüfung der Linearität der Kalibrierung über den gesamten Arbeitsbereich wurden weitere Berechnungen vorgenommen. Über die Residuen Res (Differenzen zwischen den beobachteten y-Werten und den durch die Kalibriergerade vorausgesagten \hat{y} -Werten) lassen sich die Reststandardabweichung $s_{y,x}$ und daraus die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} , sowie die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} nach DIN 32645:2008-11 berechnen (Gl. 3-5 bis 3-8) (DIN 32645:2008-11, 2008).

$$\text{Res}_i = y_i - \hat{y}_i \quad (\text{Gl. 3-5})$$

$$s_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (\text{Gl. 3-6})$$

$$s_{x0} = \frac{s_{y,x}}{b} \quad (\text{Gl. 3-7})$$

$$V_{x0} = \frac{s_{x0}}{\bar{x}_1} \cdot 100 \% \quad (\text{Gl. 3-8})$$

mit:

y_i Messwert (gemessener Response)

\hat{y}_i durch die Kalibriergerade berechneter Funktionswert (Response)

n Anzahl der Kalibrierniveaus

b Steigung der Kalibrierfunktion

\bar{x}_1 Mitte des Kalibrierbereichs

Die Reststandardabweichung $s_{y,x}$ ist ein Maß für die Streuung der Messwerte um die Ausgleichsgerade. Über die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} wird die Leistungsfähigkeit des

Messverfahrens ausgedrückt. Die Berechnung erfolgt als Quotient aus der Reststandardabweichung und der Steigung b , welche ein Maß für die Empfindlichkeit darstellt (Gl. 3-7). Die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} wird als Quotient aus der Verfahrensstandardabweichung und dem Mittelwert des Kalibrierbereichs ausgedrückt (Gl. 3-8). Alle diese drei beschriebenen statistischen Größen werden zur Beschreibung einer Kalibriergeraden herangezogen.

Tabelle 3-20: Verfahrenskenndaten der Kalibrierung am Beispiel Möhrenrüben.

Analyt	Korrelationskoeffizient R	Bestimmtheitsmaß R^2	Verfahrensstandardabweichung / $\mu\text{g kg}^{-1}$	Relative Verfahrensstandardabweichung / %
(Epi)-CTC	0,999736	0,999473	0,25	1,3
(Epi)-iso-CTC	0,999963	0,999926	0,16	0,8
(Epi)-DOX	0,999962	0,999925	0,17	0,8
SMZ	0,999860	0,999719	0,36	1,8
N-Ac-SMZ	0,999738	0,999476	0,62	3,2
SMX	0,999793	0,999586	0,60	3,1
N-Ac-SMX	0,999959	0,999918	0,22	1,1

In **Tabelle 3-21** sind die auf Linearität geprüften Arbeitsbereiche für alle Matrices aufgeführt.

Tabelle 3-21: Lineare Arbeitsbereiche für alle in der vorliegenden Arbeit analysierten Matrices. Die Linearität ist für alle sieben Zielanalyte in dem beschriebenen Bereich gegeben.

Matrix	Linearer Arbeitsbereich
Grundwasser	25 bis 500 ng L^{-1}
Lößboden	1 bis 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Lysimeterwasser	1 bis 1000 ng L^{-1}
Möhrengrün	1 bis 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Möhrenrübe	0,5 bis 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Möhrenschale	0,5 bis 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Möhrenwurzeln	0,5 bis 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Rindergülle	10 bis 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ / 1 bis 100 mg kg^{-1}
Sandboden	1 bis 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Weidelgras	1 bis 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$

3.12.4 Präzision

Unter Präzision versteht man das Maß für die Streuung von Analysenergebnissen. Man unterscheidet zwischen Messpräzision und Methodenpräzision (Kromidas and Morkowski, 2011).

Durch die Messpräzision werden Variationen erfasst, die durch das Messsystem verursacht werden. Zur Bestimmung der Messpräzision wurde im LC-MS/MS-Bereich des LHLs einheitlich ein Chloramphenicol-Standard zehnfach hintereinander injiziert und der Variationskoeffizient über die Peakfläche (des ersten und zweiten Übergangs) bestimmt. Die Überprüfung galt als bestanden, wenn der Variationskoeffizient $V_k \leq 5\%$ betrug. Diese Überprüfung wurde nach Gerätewartungen durchgeführt.

Die Methodenpräzision dient zur Überprüfung der Methode von der Probeneinwaage, über die Probenvorbereitung, bis hin zur Messung und Auswertung (Gesamtverfahren). Zur Bestimmung der Methodenpräzision wurde antibiotikafreies Probenmaterial dotiert (da kein zertifiziertes Referenzmaterial für die relevanten Matrices käuflich zu erwerben war), zehnfach aufgearbeitet und der Variationskoeffizient V_k nach (Gl. 3-10) bestimmt. Für die Berechnungen wurden die gleichen Ansätze wie für die Ermittlung der Wiederfindungen verwendet (10-fache Aufarbeitung auf drei Dotierniveaus). Die Messung erfolgte an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Für alle Zielanalyte und jede Matrix, konnte ein Variationskoeffizient $\leq 10\%$ eingehalten werden. Zur Prüfung auf Normalverteilung der Werte wurde zudem ein Schnelltest nach David (Gl. 3-11) durchgeführt. Die zur Berechnung herangezogenen Formeln sind im Folgenden aufgeführt:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (\text{Gl. 3-9})$$

$$V_k = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (\text{Gl. 3-10})$$

$$PG = \frac{\text{Größter Wert} - \text{Kleinster Wert}}{\text{Standardabweichung}} = \frac{R}{s} \quad (\text{Gl. 3-11})$$

mit:

x_i Einzelwert

\bar{x} Mittelwert

n Anzahl der Messungen

s Standardabweichungen

V_k Variationskoeffizient (relative Standardabweichung)

PG Prüfgröße nach David (auf Normalverteilung)

3.12.5 Messunsicherheitsabschätzung

Die Messunsicherheit ist eine Größe, welche Variationen durch die Messmethode und Schritte der Probenaufarbeitung vereint. Mögliche Unsicherheitsquellen können zufälligen und systematischen Charakter haben. Durch Multiplikation des Variationskoeffizienten mit dem Faktor 3 kann die Messunsicherheit in guter Näherung abgeleitet werden (S 0.0.0.0.012.04, 2016).

3.12.6 Richtigkeit (Teilnahme an Ringversuchen)

Die Richtigkeit der Methoden wurde durch die Teilnahme an Ringversuchen überprüft. Sowohl für wässrige als auch für feststoffreiche Proben konnte die Richtigkeit hierdurch bestätigt werden.

Für die Überprüfung der Wassermethode wurde seit 2015 an dem Ringversuch „AZ – Arzneimittel, Industriechemikalien und Zuckerzusatzstoffe“ teilgenommen. Der Ringversuch wurde vom Umweltbundesamt Österreich in Zusammenarbeit mit der Universität für Bodenkultur Wien angeboten. Zwei Proben wurden zur Analyse versandt. Darunter befanden sich ein Oberflächenwasser und ein gereinigtes Abwasser (Ablauf einer Kläranlage). Von den sieben in der Methode etablierten Antibiotika, war Sulfamethoxazol Bestandteil der Ringversuchsprobe. Als Beurteilungsgrundlage für das Bestehen bzw. Nichtbestehen des Ringversuches wurde der z-Score herangezogen. Dieser berechnet sich wie folgt (Gl. 3-12):

$$\text{z-Score} = \frac{x_i - \bar{X}}{\sigma} \quad (\text{Gl. 3-12})$$

mit:

x_i Messwert des teilnehmenden Labors

\bar{X} ausreißerbereinigter Mittelwert der Teilnehmerergebnisse

σ Vergleichsstandardabweichung berechnet aus den ausreißerbereinigten Teilnehmerergebnissen des aktuellen Ringversuchs

Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgte nach folgendem Schema:

$|\text{z-Score}| < 2$: Ergebnis gut

$2 < |\text{z-Score}| < 3$: Ergebnis fragwürdig

$|\text{z-Score}| > 3$: Ergebnis nicht zufriedenstellend

Die Ringversuchsergebnisse sind in **Tabelle 3-22** aufgelistet. Die Messwerte lagen sehr nahe an dem Sollwert. Die Wassermethode ist somit sehr gut für den Nachweis von Sulfamethoxazol geeignet und die Richtigkeit für die anderen Parameter kann auf Grundlage der beschriebenen Methode und der damit verbundenen Kenndaten angenommen werden.

Tabelle 3-22: Ringversuchsergebnisse zu „AZ - Arzneimittel, Industriechemikalien und Zuckerzusatzstoffe“ des Umweltbundesamtes.

Parameter	Probe	Sollwert [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Messwert [$\mu\text{g L}^{-1}$]	WFR [%]	z-Score
Teilnahme im Jahr 2015					
Sulfamethoxazol	AZ2A	$0,064 \pm 0,00321$	$0,0619 \pm 0,002$	96,7	- 0,62
	AZ2B	$0,0312 \pm 0,00358$	$0,0306 \pm 0,001$	98,0	- 0,17
Teilnahme im Jahr 2016					
Sulfamethoxazol	AZ3A	$0,0468 \pm 0,00311$	$0,0464 \pm 0,0014$	99,2	- 0,11
	AZ3B	$0,0669 \pm 0,0118$	$0,0679 \pm 0,002$	101	+ 0,08

AZ2A; AZ3B: Oberflächenwasser; AZ2B; AZ3A: gereinigtes Abwasser (Ablauf einer Kläranlage)

Da für die Überprüfung der Methoden zum Nachweis von Sulfonamiden und Tetracyclinen in den Matrices Gülle, Boden, Möhren und Weidelgras kein geeignetes Ringversuchsmaterial zur Verfügung stand, wurde auf andere Ringversuchsmaterialien aus dem Lebensmittelbereich vom Anbieter FAPAS zurückgegriffen.

- 02290: Tetracycline in Honig (FAPAS)
- 02292: Sulfonamide in Honig (FAPAS)
- 02300: Tetracycline in Schweinemuskulatur (FAPAS)

In dem Testmaterial 02292 für den Nachweis von Sulfonamiden in Honig war weder Sulfamethazin noch Sulfamethoxazol oder deren *N*-acetylierte Metaboliten nachweisbar. Aus der Teilnahme an diesem Ringversuch kann dennoch abgeleitet werden, dass durch die Methode falsch-positive bzw. falsch-negative Sulfonamidnachweise ausgeschlossen werden. In dem Ringversuch 02290 „Tetracycline in Honig“ konnte Chlortetracyclin nachgewiesen werden. Bei dem Ringversuch 02300 konnten Chlortetracyclin und Doxycyclin nachgewiesen werden. Die Ergebnisabgabe für Chlortetracyclin erfolgte getrennt in CTC und der Summe aus CTC und 4-Epi-CTC. **Tabelle 3-23** gibt einen Überblick über die Ringversuchsergebnisse. Die Probenaufarbeitungs- und die Messmethode sind demnach prinzipiell für die Analyse von anderen feststoffreichen Matrices in dem Konzentrationsbereich des Ringversuches geeignet. Der Laborvergleich (**Abbildung 3-12**) zeigt ein sehr gutes Abschneiden des Hessischen Landeslabors im Vergleich zu allen Teilnehmern.

Tabelle 3-23: Ringversuchsergebnisse zu „02290 - Tetracycline in Honig und 02300 - Tetracycline in Schweinemuskulatur“ des Anbieters FAPAS.

Parameter	Sollwert [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Messwert [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	z-Score
02290 - Tetracycline in Honig			
Chlortetracyclin	81,7	68,4	- 0,7
02300 - Tetracycline in Schweinemuskulatur			
Chlortetracyclin	80,9	74,8	- 0,3
Summe-Chlortetracyclin + Epimer	106,0	111,6	+ 0,2
Doxycyclin	220,1	235,9	+ 0,4

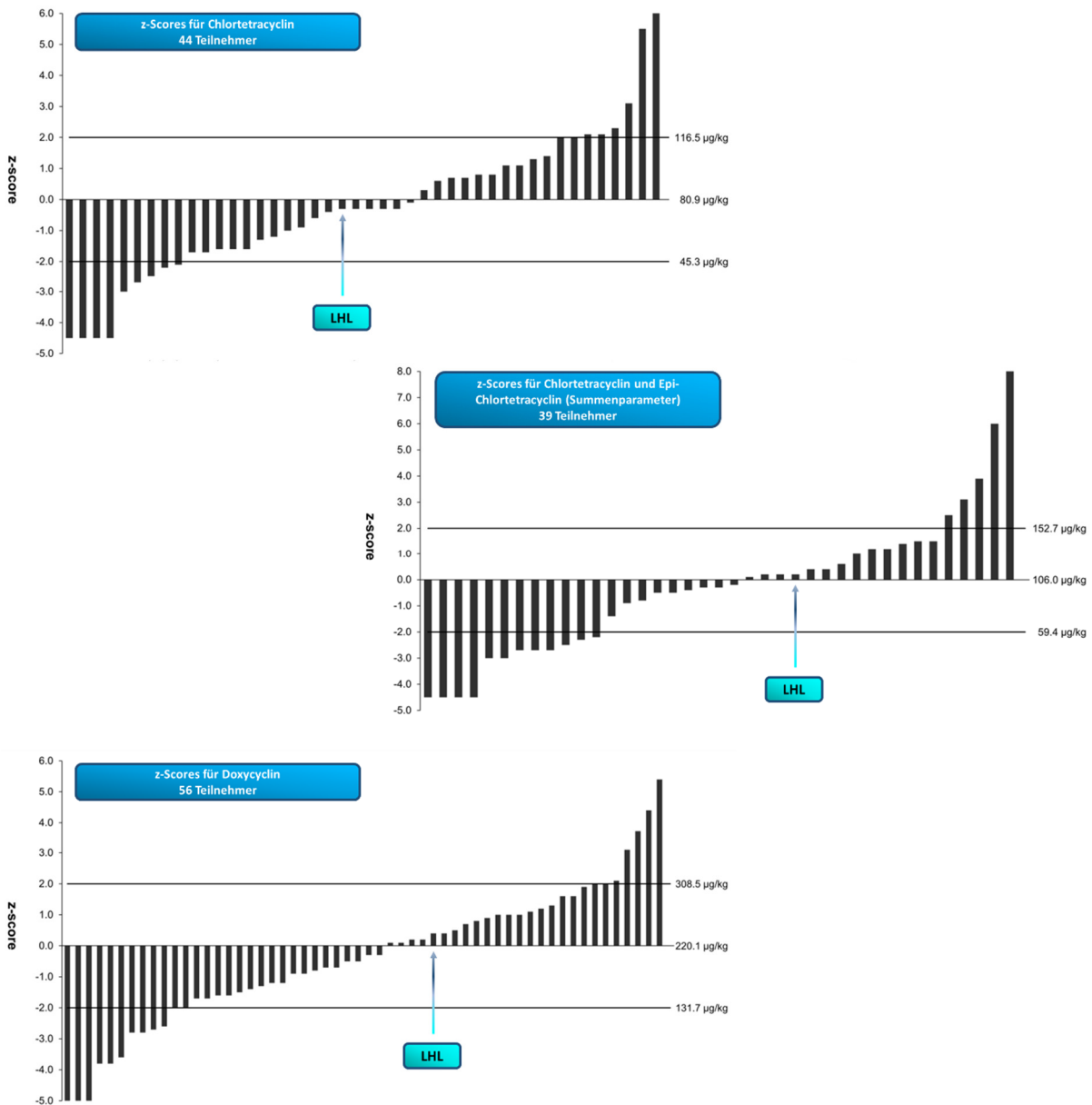


Abbildung 3-12: Laborvergleichsuntersuchung 02300 des Anbieters FAPAS - Testmaterial: Schweinemuskulatur.

3.12.7 Weitere qualitätssichernde Maßnahmen

In jeder Messserie wurden Qualitätskontrollstandards mitgemessen. Hierzu wurde analytrefreie Matrix im mittleren Konzentrationsbereich der Kalibrierung dotiert und analog den Proben aufgearbeitet. Die Quantifizierung erfolgte, in Analogie zu den Proben, über eine Matrixkalibrierfunktion. Die erhaltenen Messwerte wurden in eine Mittelwertkontrollkarte übertragen. Die Abweichung dieser Standards zu dem dotierten Wert, durfte $\pm 15\%$ nicht über- bzw. unterschreiten.

4 Ergebnisse

In diesem Kapitel sind die Ergebnisse der Methodenentwicklung und die Validierungsdaten aufgeführt. Zudem beinhaltet das Kapitel die Analysenergebnisse der untersuchten Umwelt- (Gülle, Boden, Lysimetersickerwasser, Grundwasser), Futtermittel- (Weidelgras) und Lebensmittelproben (Möhren) nach Projekten geordnet.

4.1 Ergebnisse der Methodenentwicklung

Die Entwicklung und Optimierung der Probenvorbereitungsmethode für feststoffreiche Umweltproben wurde anhand von Rindergülle vorgenommen. Die Vorgehensweise ist in **Kapitel 3.10** beschrieben.

4.1.1 Fest-Flüssig-Extraktion

Für die Entwicklung und Optimierung der Fest-Flüssig-Extraktion wurden verschiedene organische und wässrige Extraktionsmittel, sowie unterschiedliche Extraktionsbedingungen getestet (**Abbildung 3-6**). Die Durchführung der Tests erfolgte gemäß den Angaben in **Kapitel 3.10.1**.

Organische Lösungsmittel

Abbildung 4-1 fasst die Wiederfindungen bei Verwendung organischer Lösungsmittel als Extraktionsmittel zusammen. Für die Extraktion der Sulfonamide aus Rindergülle erwiesen sich organische Lösungsmittel als geeignet. Die Wiederfindungen betragen bei Verwendung von Methanol, Acetonitril und Aceton $\geq 90\%$. Im Gegensatz dazu konnten Tetracycline mit Hilfe organischer Lösungsmittel nicht vollständig aus der Gülle herausgelöst werden. Die Wiederfindungen lagen zwischen $0,2\%$ und 48% . Für die Entwicklung einer Multimethode zur simultanen Erfassung von Tetracyclinen und Sulfonamiden ist nach **Abbildung 4-1** ein alleiniger Zusatz organischer Extraktionsmittel nicht ausreichend.

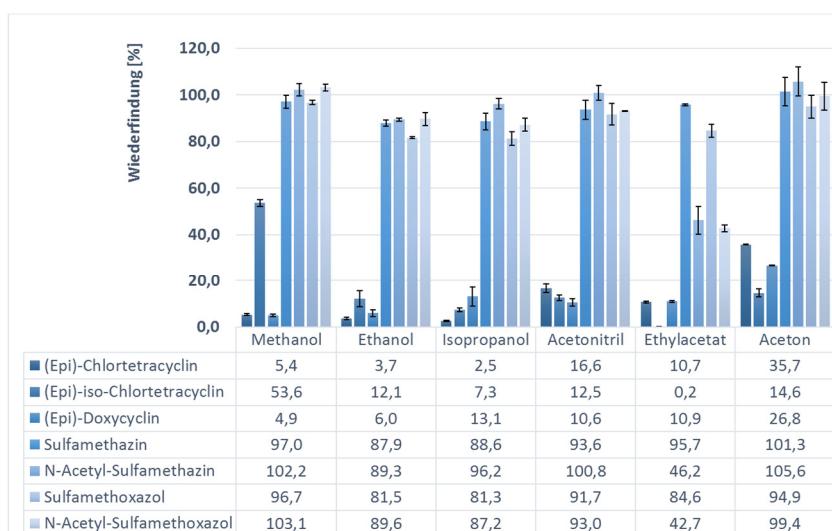


Abbildung 4-1: Wiederfindungen bei Verwendung verschiedener organischer Lösungsmittel zur Extraktion von Antibiotika aus Gülle.

Wässrige Citrat-Phosphat-Puffersysteme

Abbildung 4-2 stellt die erhaltenen Ergebnisse bei Verwendung wässriger Citrat-Phosphat-Puffersysteme als Extraktionsmittel dar. Die Verwendung von McIlvaine-Puffer pH 4 führte für nahezu alle Analyten, ausgenommen (Epi)-Doxycyclin, zu Wiederfindungen $\geq 78\%$. Die Extraktionen mit McIlvaine-Puffer pH 7 waren mit diesen vergleichbar. Für die Sulfonamide konnten die Wiederfindungen unter neutralen Bedingungen gesteigert werden. Durch Verwendung von McIlvaine-Puffer pH 10 stieg die Wiederfindung für (Epi)-Doxycyclin von 60 % auf $> 80\%$ an. (Epi)-Chlortetracyclin wurde unter alkalischen Bedingungen in seine Isoform umgewandelt und war als (Epi)-iso-Chlortetracyclin nachweisbar (**Abbildung 4-3**). Citratpuffer zeigte vergleichbare oder etwas schlechtere Extraktionseigenschaften als McIlvaine-Puffer.

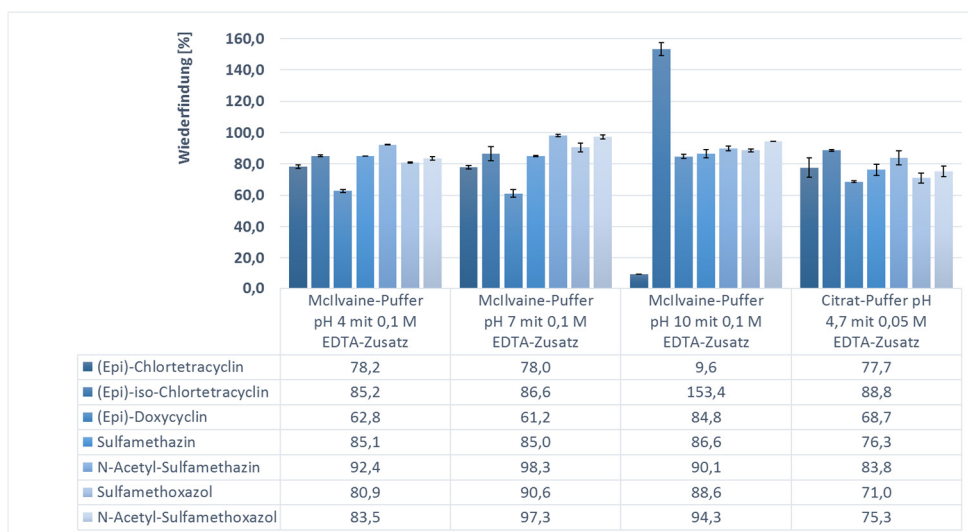


Abbildung 4-2: Wiederfindungen bei Verwendung wässriger Puffersysteme unterschiedlicher pH-Werte zur Extraktion von Antibiotika aus Gülle.

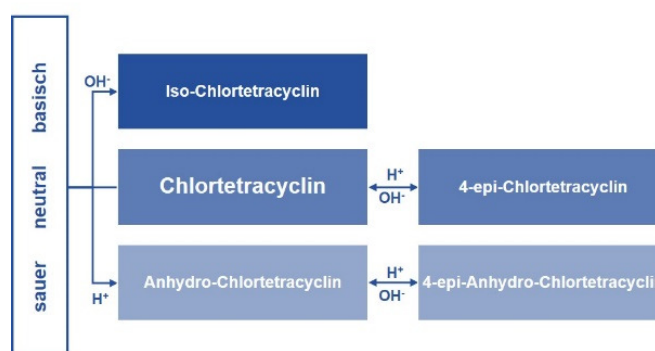


Abbildung 4-3: Zerfallsprodukte des Chlortetracyclins. Modifiziert nach (Søeborg et al., 2004).

Im Vergleich zu den organischen Extraktionsmitteln konnte durch die Verwendung von McIlvaine-Puffer eine simultane Extraktion von Tetracyclinen und Sulfonamiden in einem Wiederfindungsbereich von 61 % – 153 % erfolgen. Durch weitere Optimierungen der Extraktionsbedingungen wie Extraktionstemperatur und Extraktionszeit wurde überprüft, ob eine Steigerung der Wiederfindungen möglichst ohne organischen Lösungsmiteleinsatz erfolgen kann.

Extraktionstemperatur

Neben dem pH-Wert ist auch die Temperatur entscheidend für die Umwandlung von (Epi)-Chlortetracyclin in seine Isoform. Mit steigender Temperatur nahm die Umwandlung zu (vgl. **Abbildung 4-4** bis **Abbildung 4-6**). Zur besseren Vergleichbarkeit der gewählten Extraktionsmittel und Extraktionsbedingungen wurden die mittleren Wiederfindungen (arithmetischer Mittelwert) aus den sieben Zielanalyten gebildet. Diese sind in **Tabelle 4-1** zusammenfassend dargestellt.

Da Sulfonamide im Vergleich zu Tetracyclinen höhere Peakintensitäten im analytischen Nachweisverfahren zeigten, wurde der Fokus bei den weiteren Optimierungen auf die Steigerung der Extraktionsausbeuten für Tetracycline gelegt.

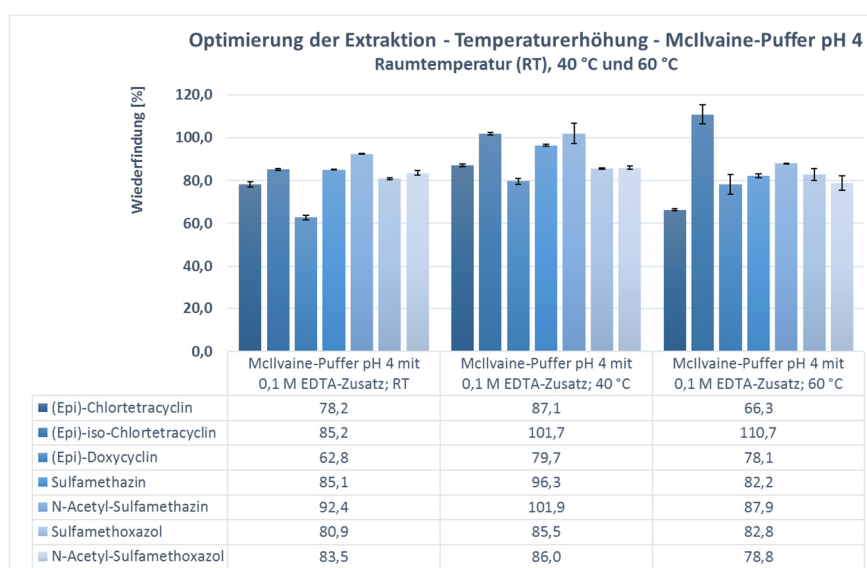


Abbildung 4-4: Optimierung der Extraktionsbedingungen bei Verwendung von Mcllvaine-Puffer pH 4 als Extraktionsmittel. Vergleich des Temperatureinflusses auf die Wiederfindungsraten.

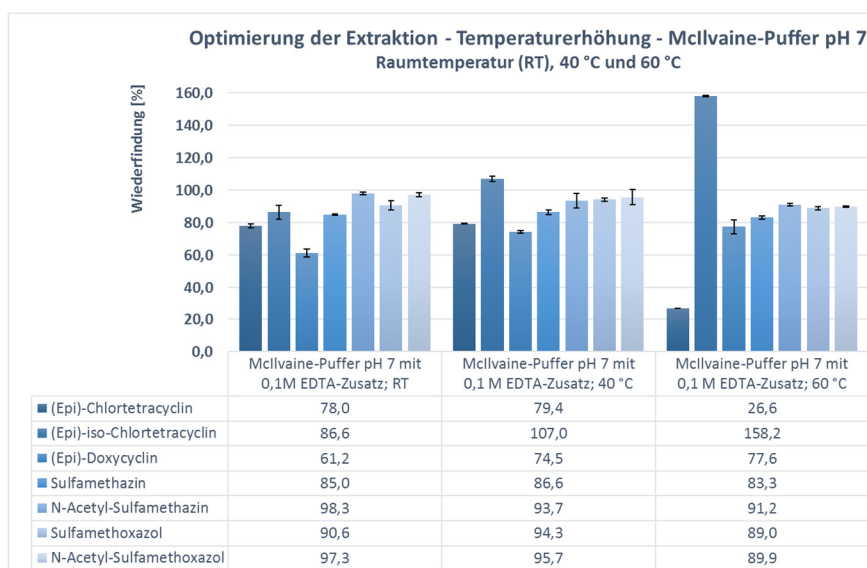


Abbildung 4-5: Optimierung der Extraktionsbedingungen bei Verwendung von Mcllvaine-Puffer pH 7 als Extraktionsmittel. Vergleich des Temperatureinflusses auf die Wiederfindungsraten.

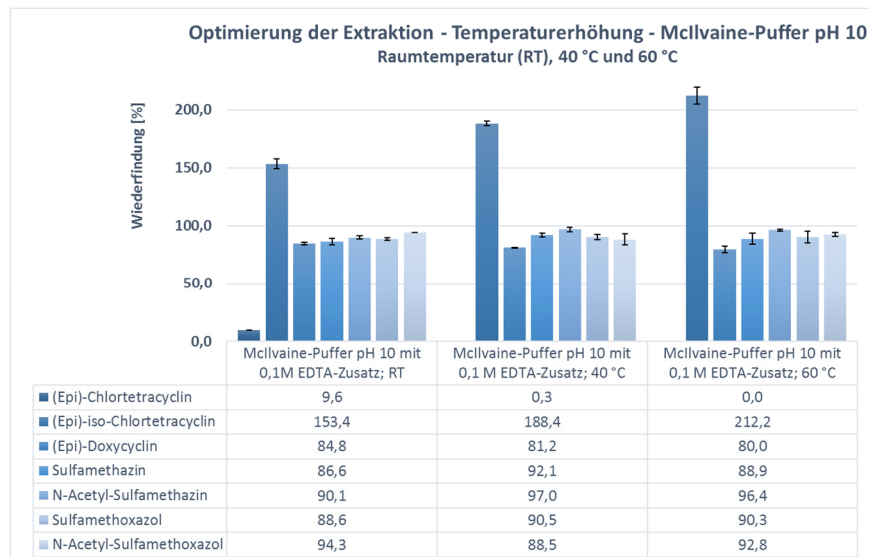


Abbildung 4-6: Optimierung der Extraktionsbedingungen bei Verwendung von McIlvaine-Puffer pH 10 als Extraktionsmittel. Vergleich des Temperatureinflusses auf die Wiederfindungsraten.

Tabelle 4-1: Mittlere Wiederfindungsraten (WDF) bei Extraktion mit verschiedenen Puffern bei verschiedenen Temperaturen.

McIlvaine-Puffer mit 0,1 M EDTA-Zusatz	Extraktionsbedingung	Mittlere WDF* [%]
pH-Wert	Temperatur	
4,0 ± 0,1	20 °C	81,2
7,0 ± 0,1	20 °C	85,3
10,0 ± 0,1	20 °C	86,8
4,0 ± 0,1	40 °C	91,2
7,0 ± 0,1	40 °C	90,2
10,0 ± 0,1	40 °C	91,1
4,0 ± 0,1	60 °C	83,8
7,0 ± 0,1	60 °C	88,0
10,0 ± 0,1	60 °C	94,4

*arithmetischer Mittelwert

Für die weiteren Optimierungsversuche wurde McIlvaine-Puffer pH 4 mit 0,1 M EDTA-Zusatz verwendet. Als Extraktionstemperatur wurde 40 °C gewählt. Hier zeigten Tetracycline die höchsten Wiederfindungen.

Die Optimierungen in Bezug auf die Extraktionszeit, die Extraktionszyklen und den EDTA-Zusatz wurden gemäß den Angaben in **Kapitel 3.10.1.2** durchgeführt. Die Auswertung zeigte, dass nach einer Extraktionszeit von 15 Minuten keine weitere Steigerung der Extraktionsausbeute festgestellt werden konnte. Die Extraktionsdauer wurde daher auf 15 Minuten festgelegt. Durch einen weiteren Extraktionszyklus konnten die Wiederfindungen der einzelnen Analyte um 2 % – 17 % gesteigert werden. Daher wurden zwei Extraktionszyklen mit je 5 mL Extraktionsmittel gewählt. Eine EDTA-Konzentration von 0,05 M führte zu vergleichbar guten oder besseren Wiederfindungen (Steigerung um 7 % – 19 %). Daher wurde mit einem EDTA-Zusatz von 0,05 M gearbeitet.

4.1.2 Festphasenextraktion

Für die Entwicklung und Optimierung der Festphasenextraktion wurden verschiedene Kartuschen getestet (**Abbildung 3-7**). Die Durchführung der Tests erfolgte gemäß den Angaben in **Kapitel 3.10.2**.

4.1.2.1 Auswahl der SPE-Kartusche: Screening ohne Gülle-Zusatz

Abbildung 4-7 und **Abbildung 4-8** zeigen die ermittelten Wiederfindungen bei Aufgabe eines antibiotikahaltigen Lösungsmittelstandards. Alle getesteten Kartuschen eignen sich für die simultane Anreicherung von Tetracyclinen und Sulfonamiden. Die flächenbezogenen Wiederfindungen (arithmetische Mittelwerte der Dreifachbestimmung) der Tetracycline lagen bei allen drei getesteten Kartuschen zwischen 93 % und 103 %. Für Sulfonamide wurden Wiederfindungen zwischen 88 % und 106 % erreicht. Somit sind Analytverluste über die Kartuschen als vernachlässigbar anzusehen. Durch Einbeziehung der internen Standardsubstanzen konnten diese kompensiert werden.

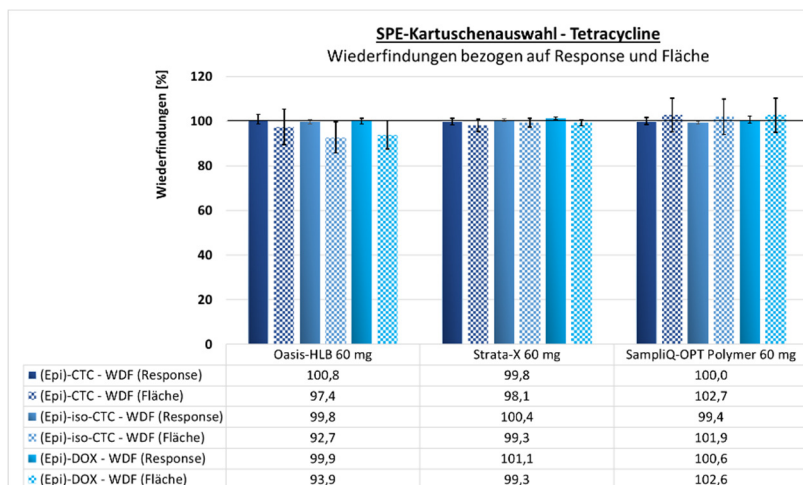


Abbildung 4-7: SPE-Kartuschenauswahl: Wiederfindungen der Tetracycline nach deren Aufbringung auf Oasis HLB-, Strata-X- und SampliQ-OPT-Polymer-Kartuschen bezogen auf einen Lösungsmittelstandard.

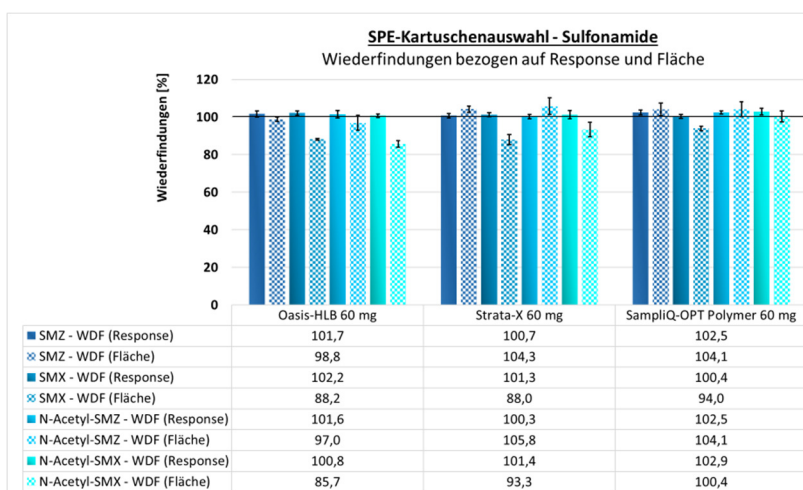


Abbildung 4-8: SPE-Kartuschenauswahl: Wiederfindungen der Sulfonamide nach deren Aufbringung auf Oasis HLB-, Strata-X- und SampliQ-OPT-Polymer-Kartuschen bezogen auf einen Lösungsmittelstandard.

4.1.2.2 Screening mit Gülle-Zusatz

Für die Tests mit Matrixzugabe in Form von Rindergülle wurden aufgrund der guten Wiederfindungen alle drei Kartuschen herangezogen (**Abbildung 4-7** und **Abbildung 4-8**). Darüber hinaus wurden die Strata-X-Kartusche und die Oasis-HLB-Kartusche mit 200 mg Sorbent-Packungen getestet. Am Beispiel der Strata-X 60 mg Kartuschen sind die Wiederfindungen für Tetracycline in der **Abbildung 4-9** und für Sulfonamide in **Abbildung 4-10** graphisch dargestellt. Die Bestimmungen wurden in Dreifachaufarbeitung durchgeführt.

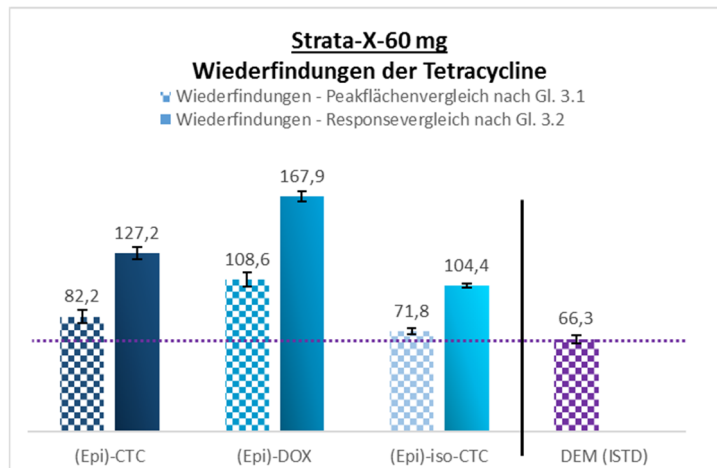


Abbildung 4-9: Wiederfindungen der Tetracycline in Rindergülle nach Aufreinigung und Anreicherung der Extrakte über Strata-X 60 mg Kartuschen im Vergleich zu Lösungsmittelstandards der gleichen Analytkonzentration.

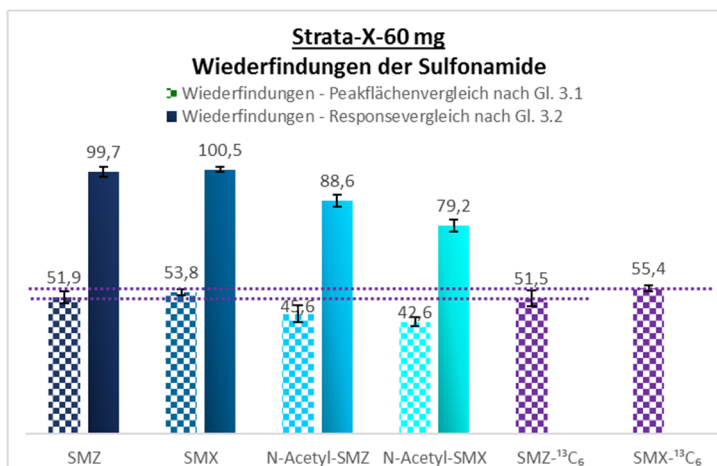


Abbildung 4-10: Wiederfindungen der Sulfonamide in Rindergülle nach Aufreinigung und Anreicherung der Extrakte über Strata-X 60 mg Kartuschen im Vergleich zu Lösungsmittelstandards der gleichen Analytkonzentration.

Durch die Festphasenextraktion kommt es neben der Anreicherung der Analyten häufig auch zu einer Aufkonzentrierung der Matrix und damit verbunden, zum Auftreten von Matrixeffekten. Durch einen Peakflächeneinheitenvergleich zwischen dem Analyten in der Matrix und dem Analyten im Lösungsmittel können die unterschiedlichen Matrixeinflüsse ermittelt werden. Aus der Wirkstoffgruppe der Tetracycline zeigte Demeclocyclin den stärksten Matrixeffekt (**Abbildung 4-9**). Lediglich 66 % der Peakflächeneinheit wurde im Vergleich zu einem matrixfreien Standard wiedergefunden. Für (Epi)-Chlortetracyclin, (Epi)-Doxycyclin und (Epi)-iso-

Chlortetracyclin lagen die Wiederfindungen im Bereich von 72 % bis 109 %. Eine Quantifizierung der Tetracycline über eine Lösungsmittelkalibrierung mit Demeclocyclin als internem Standard führte zu Überbefunden der Zielanalyte (Responsevergleich).

Sulfonamide wiesen einen noch stärker ausgeprägten Matrixeffekt auf als Tetracycline (**Abbildung 4-10**). Im Vergleich zu einem matrixfreien Standard wurden lediglich ca. 50 % der Peakflächeneinheit wiedergefunden. Für die Quantifizierung der Sulfonamide (SMZ, SMX) wurden die korrespondierenden $^{13}\text{C}_6$ -Analoge als interne Standards verwendet. Wie aus dem Responsevergleich hervorgeht, konnten mögliche Matrixeinflüsse über die internen Standards hierdurch kompensiert werden.

Die Quantifizierung der acetylierten Metabolite (*N*-Ac-SMZ, *N*-Ac-SMX) erfolgte ebenfalls über die $^{13}\text{C}_6$ markierten Ursprungssubstanzen (SMZ- $^{13}\text{C}_6$, SMX- $^{13}\text{C}_6$). Da die Metabolite etwas stärkeren Matrixeinflüssen ausgesetzt waren als SMZ und SMX, wurden unter Einbeziehung der internen Standards Unterbefunde für diese Stoffe ermittelt.

Aus **Abbildung 4-9** und **Abbildung 4-10** ergibt sich die Aussage, dass lediglich Sulfamethazin und Sulfamethoxazol über Lösungsmittelkalibrierungen mit internem Standard quantifiziert werden können, ohne Korrektur des Ergebnisses in Bezug auf die Wiederfindung. Durch die Beziehung auf einen Matrixstandard wurde geprüft, ob eine Kompensation der unterschiedlichen Matrixeffekte für die Tetracycline und die *N*-acetylierten Sulfonamide erfolgen kann (**Abbildung 4-11**).

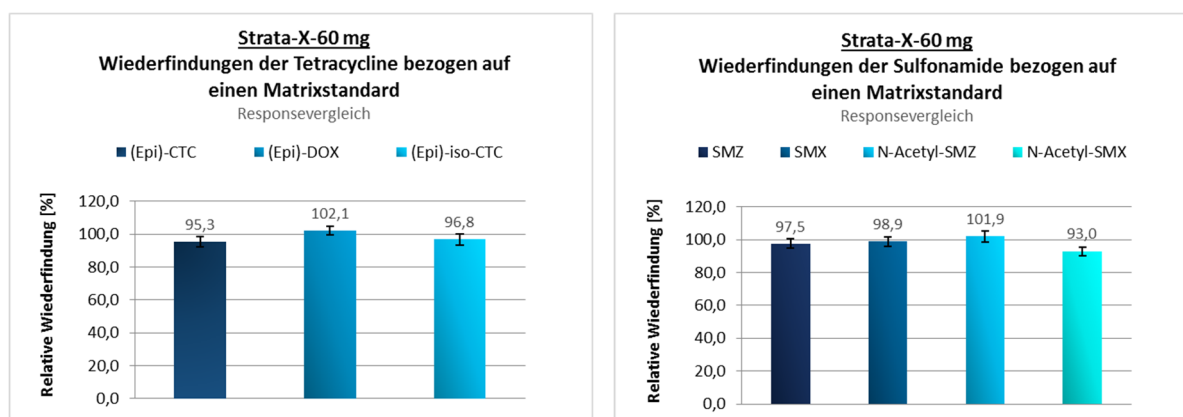


Abbildung 4-11: Wiederfindungen der Tetracycline und Sulfonamide in Rindergülle nach Aufreinigung und Anreicherung der Extrakte über Strata-X 60 mg Kartuschen im Vergleich zu Matrixstandards der gleichen Analytkonzentration.

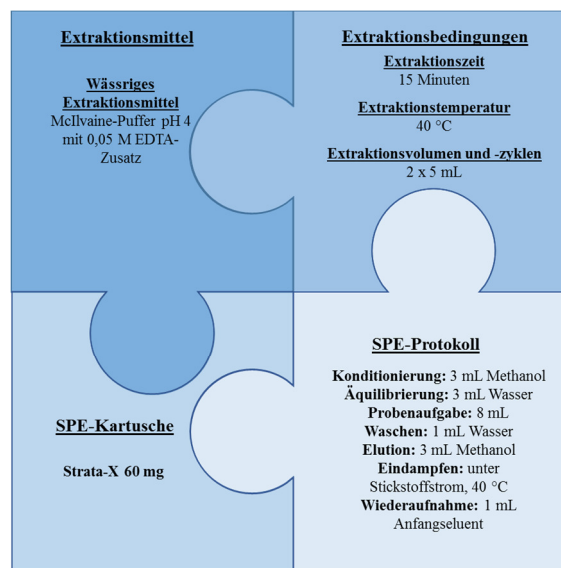
Die Quantifizierung über einen Matrixstandard führte nach **Abbildung 4-11** für alle sieben Analyten zu sehr guten Ergebnissen. Die Wiederfindungen lagen im Bereich von 93 % und 102 %. Selbst bei einem Flächenverlust von ca. 50 % wiesen die Sulfonamide noch vergleichbare oder höhere Peakflächeneinheiten auf als Tetracycline. Daher ist die Methode anwendbar für den simultanen Nachweis beider Wirkstoffgruppen im unteren $\mu\text{g kg}^{-1}$ -Bereich. Weitere Optimierungen zur Verringerung des Matrixeinflusses durch Verdünnung der Probenextrakte und Durchführung des SPE-Waschschrittes mit Wasser und Methanolzusätzen (5, 10 und 50 %) führten lediglich zu Flächenverlusten. Die Durchführung des Waschschrittes mit 1 mL Wasser erwies sich am geeignetsten. Auf eine Verdünnung der Extrakte oder weitere Optimierungen

der Waschschriffe wurde aufgrund der sehr guten Wiederfindungen gegen eine Matrixkalibrierung verzichtet. Zudem wurden sehr niedrige Bestimmungsgrenzen (vgl. **Kapitel 4.2**) erreicht. Die Quantifizierung der Proben erfolgte daher für alle Matrices über Matrixkalibrierungen und Zusatz eines internen Standards.

Die Ergebnisse der anderen vier getesteten Kartuschen sind in **Tabelle 4-2** zusammengefasst. Sowohl die Strata-X als auch die Oasis HLB Kartusche ist für die Anreicherung der Tetracycline und Sulfonamide aus Gülleextrakten geeignet. Der Vorteil der Strata-X-Kartusche lag in der schnelleren Durchlaufgeschwindigkeit (ca. 15 Minuten) der Probe. Das Anlegen von Vakuum war nicht notwendig. Da die Methode zur Untersuchung eines großen Probenumfanges dienen sollte, wurde die Strata-X-Kartusche als geeignetes Festphasenmaterial verwendet. Die Sorbentmenge hatte keinen bedeutenden Einfluss auf die Wiederfindungen, weshalb eine Sorbentmenge von 60 mg beibehalten wurde. Die SampliQ-OPT-Kartusche verstopfte durch die Probenaufgabe und war somit nicht für die Aufarbeitung matrixreicher Proben geeignet.

Tabelle 4-2: Gegenüberstellung der Wiederfindungen.

Kartusche	WDF [%]							WDF [%]						
	bezogen auf Lösungsmittelstandards der gleichen Analytkonzentration							bezogen auf Matrixstandards der gleichen Analytkonzentration						
	(Epi)-CTC	(Epi)-DOX	(Epi)-iso-CTC	SMZ	SMX	N-Ac-SMZ	N-Ac-SMX	(Epi)-CTC	(Epi)-DOX	(Epi)-iso-CTC	SMZ	SMX	N-Ac-SMZ	N-Ac-SMX
Strata-X 60 mg 3 cc	82	109	72	52	54	46	43	95	102	97	98	99	102	93
Strata-X 200 mg 3 cc	75	91	68	48	51	46	45	97	94	102	98	99	100	100
Oasis HLB 60 mg 3 cc	69	94	67	43	44	42	38	102	106	104	99	100	110	101
Oasis HLB 200 mg 6 cc	79	98	74	48	53	49	45	103	99	106	97	99	102	95



Übertragbarkeit der Methode auf die Matrices Weidelgras, Möhrenrübe, Möhrenschele, Möhrengrün, Möhrenwurzeln, Sandboden und Lößboden testen

Abbildung 4-12: Optimierte Probenvorbereitungsbedingungen für den Nachweis von Antibiotikarückständen in Gülle.

4.1.3 Übertragung der optimierten Probenaufarbeitungsmethode auf weitere Matrices

Tabelle 4-3: Prüfung der Übertragbarkeit der Probenaufarbeitungsmethode für Gülle auf weitere Matrices.

Übertragung möglich	Matrix
✓	Gülle, Deutsches Weidelgras, Möhrengrün, Möhrenrübe, Möhrenschnitz, Möhrenwurzel
✗	Volkmarser Sandboden, Baunataler Lößboden

Zur Bestimmung von Antibiotika in Bodenproben musste die entwickelte Probenaufarbeitungsmethode abgewandelt werden. Die durchgeführten Optimierungen wurden gemäß den Angaben in **Kapitel 3.10.3** vorgenommen.

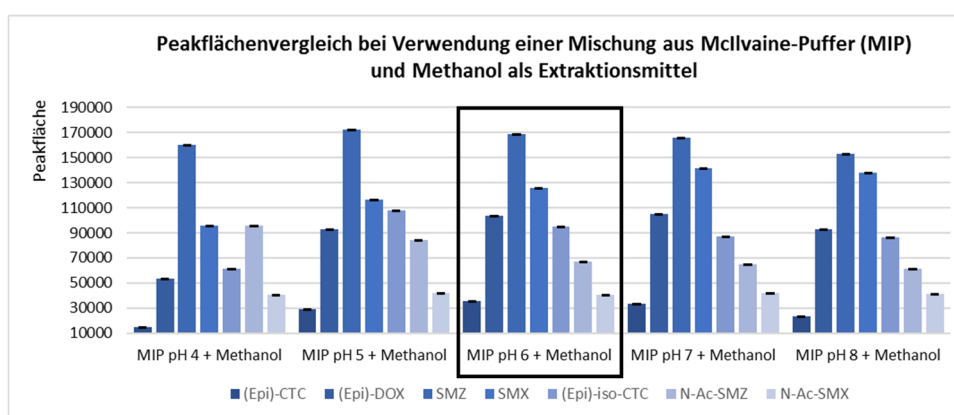


Abbildung 4-13: Optimierung der Extraktionsmittelzusammensetzung für den Nachweis von Antibiotika im Boden.

Nach **Abbildung 4-13** weist (Epi)-Chlortetracyclin die geringsten Peakflächeneinheiten auf. Bei der Auswahl des besten Extraktionsgemisches wurde sich daher auf die Maximierung der Peakfläche für diesen Wirkstoff fokussiert. Aus allen getesteten Extraktionsmitteln erwies sich die Verwendung einer Mischung aus McIlvaine-Puffer pH 6 (mit 0,05 M EDTA-Zusatz) und Methanol am geeignetsten. Weitere Optimierungen fanden unter Variation des Lösungsmittels statt. Unter identischen Bedingungen wie unter **Kapitel 3.10.3** beschrieben, wurden Aceton, Acetonitril und Ethylacetat an Stelle von Methanol verwendet.

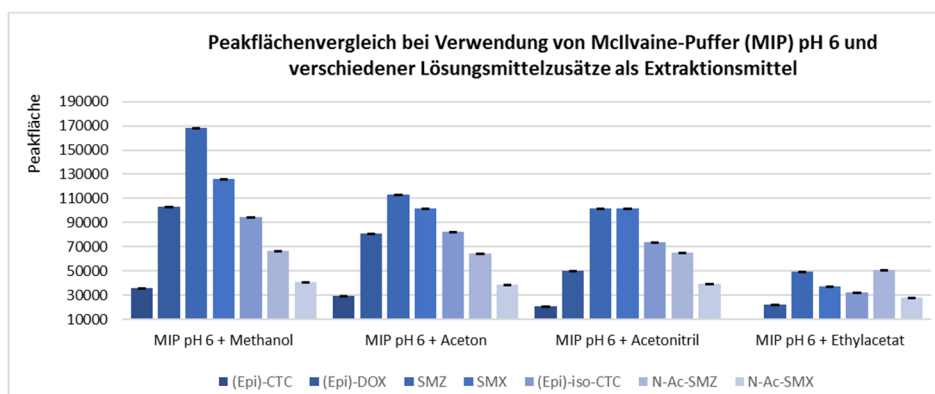


Abbildung 4-14: Weitere Optimierung der Extraktionsmittelzusammensetzung für den Nachweis von Antibiotika im Boden.

Durch Verwendung anderer Lösungsmittel konnte im Vergleich zu Methanol keine Verbesserung der Extraktionsausbeute festgestellt werden (**Abbildung 4-14**). Optimierungen in Bezug auf die Extraktionszeit (5, 15, 30 Minuten) und die Extraktionstemperatur (RT, 40 °C, 60 °C, 80 °C) wurden ebenfalls durchgeführt. Extraktionsbedingungen von 5 Minuten bei 60 °C im Ultraschallbad führten zu den besten Ergebnissen. Die Wiederfindungen wurden gegen einen matrixfreien Lösungsmittelstandard der gleichen Analytkonzentration bestimmt. Für die Tetracycline lagen diese im Bereich von 57 % bis 60 %. Für Sulfonamide wurden Wiederfindungen von 74 % bis 82 % erreicht. Durch die Quantifizierung der Proben über eine Matrixkalibrierung, konnten auch hier die Matrixeinflüsse kompensiert werden.

4.1.4 Bestimmung von Antibiotika in Bodeneluaten aus Lysimeterstudien

Die Probe wurde mit 5 % McIlvaine-Puffer (pH 4, pH 5, pH 6, pH 7; 0,1 M EDTA-Zusatz) und 20 µL ISTD 2 (**Tabelle 3-9**) versetzt und gemäß **Kapitel 3.11.2** aufgearbeitet. Der Zusatz von McIlvaine-Puffer pH 4 führte zu den besten Wiederfindungen. Im Vergleich zu Proben ohne Pufferzusatz, konnten für die Tetracycline hierdurch die Wiederfindungen von 54 % bzw. 78 % auf ≥ 98 % gesteigert werden. Für die Sulfonamide betragen die Wiederfindungen mit und ohne Pufferzusatz > 81 % (**Abbildung 4-15**).

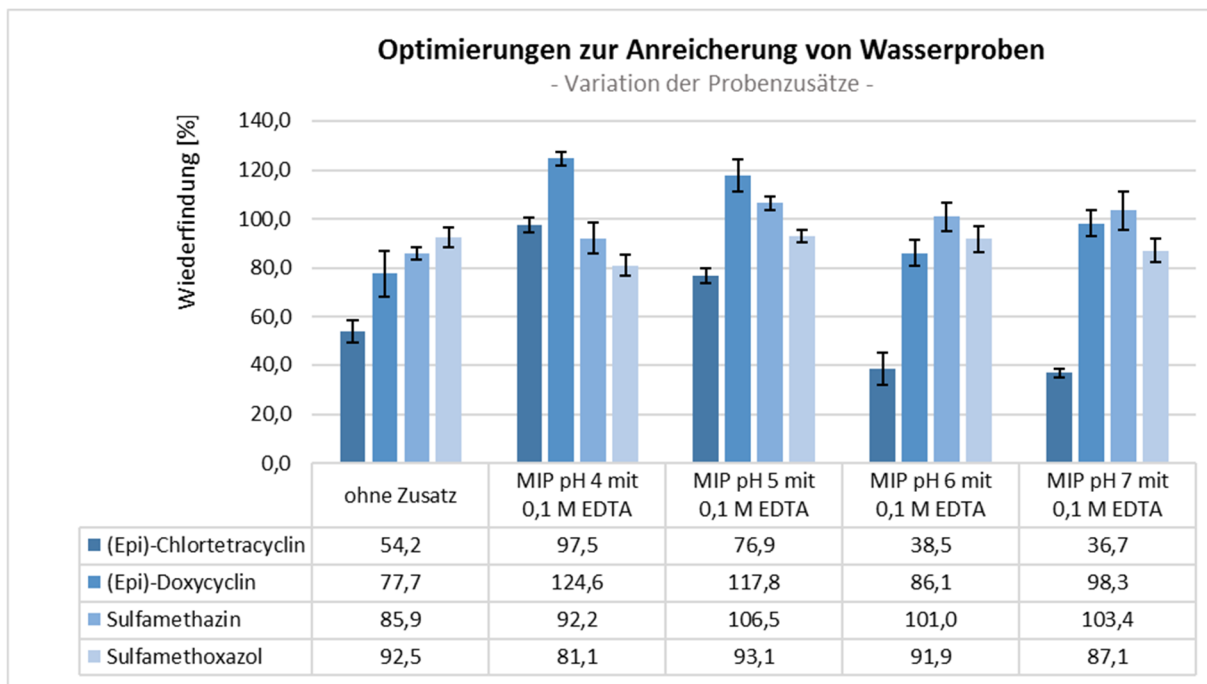


Abbildung 4-15: Gegenüberstellung der verschiedenen Probenzusätze zur Optimierung der Anreicherung von Wasserproben.

4.2 Verfahrenskenndaten

Die Verfahrenskenndaten wurden gemäß den Angaben in **Kapitel 3.12** bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 4-4** bis **Tabelle 4-13** zusammengestellt.

4.2.1 Verfahrenskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Gülle

Tabelle 4-4: Validierungskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Rindergülle.

Validierungsdaten für Rindergülle								
Analyt	NG, EG, BG nach DIN 32645 [µg/kg]			Dotierung [µg/kg] (n = 6)	relative WDF [%]		V _K [%]	
	X _{NG} (n = 3)	X _{EG} (n = 3)	X _{BG} * (n = 3)		intraday (1 Tag)	interday (3 Tage)	intraday (1 Tag)	interday (3 Tage)
(Epi)-CTC	0,41 (0,30-0,49)	0,82 (0,60-0,97)	1,34 (1,00-1,58)	2,0	104,2	102,9	0,98	2,26
				10,0	101,1	101,5	0,76	2,04
(Epi)-iso-CTC	0,61 (0,51-0,79)	1,22 (1,02-1,58)	1,94 (1,66-2,47)	2,0	101,5	102,5	0,90	1,66
				10,0	105,7	103,7	0,70	1,27
(Epi)-DOX	0,57 (0,49-0,66)	1,07 (0,97-1,13)	1,73 (1,58-1,82)	2,0	102,3	105,3	1,00	1,76
				10,0	101,8	102,5	0,68	1,51
N-Acetyl-SMZ	0,37 (0,28-0,50)	0,73 (0,57-0,99)	1,20 (0,94-1,62)	2,0	102,9	104,2	2,68	2,71
				10,0	101,0	101,6	0,50	0,73
N-Acetyl-SMX	0,48 (0,37-0,68)	0,96 (0,75-1,36)	1,54 (1,23-2,16)	2,0	101,8	103,0	1,11	2,02
				10,0	101,5	101,4	0,68	0,83
SMZ	0,45 (0,28-0,59)	0,91 (0,55-1,18)	1,47 (0,92-1,88)	2,0	101,0	102,7	0,82	1,57
				10,0	102,1	101,8	0,84	1,07
SMX	0,53 (0,26-0,91)	1,07 (0,52-1,82)	1,70 (0,86-2,82)	2,0	102,7	103,1	1,10	1,25
				10,0	100,8	100,9	0,65	0,73

*Die Bestimmungsgrenze wurde für alle Analyte auf 2 µg kg⁻¹ normiert.

4.2.2 Verfahrenskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Weidelgras

Tabelle 4-5: Validierungskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Weidelgras.

Validierungsdaten für Deutsches Weidelgras „Lemmos“								
Analyt	NG, EG, BG nach DIN 32645 [µg/kg]			Dotierung [µg/kg] (n = 10)	relative WDF [%]		V _K [%]	
	X _{NG} (n = 3)	X _{EG} (n = 3)	X _{BG} * (n = 3)		intraday (1 Tag)	interday (3 Tage)	intraday (1 Tag)	interday (3 Tage)
(Epi)-CTC	0,23 (0,17-0,29)	0,45 (0,33-0,57)	0,73 (0,55-0,91)	1,0	98,3	99,5	1,88	2,27
				5,0	100,0	100,1	0,78	1,03
				50,0	99,7	100,2	1,42	1,79
(Epi)-iso-CTC	0,18 (0,16-0,20)	0,36 (0,33-0,41)	0,59 (0,54-0,67)	1,0	101,5	101,0	1,15	2,40
				5,0	100,2	100,5	1,07	1,27
				50,0	100,1	100,3	0,78	1,34
(Epi)-DOX	0,15 (0,11-0,18)	0,31 (0,22-0,36)	0,51 (0,37-0,59)	1,0	103,1	101,9	2,35	2,70
				5,0	100,7	100,4	1,00	1,11
				50,0	100,0	100,5	1,14	1,32
N-Acetyl-SMZ	0,18 (0,13-0,25)	0,35 (0,26-0,50)	0,58 (0,44-0,80)	1,0	100,4	102,2	1,02	2,16
				5,0	99,7	99,8	0,87	0,97
				50,0	100,9	100,6	0,93	1,23
N-Acetyl-SMX	0,22 (0,19-0,25)	0,43 (0,38-0,50)	0,71 (0,36-0,81)	1,0	100,4	101,3	1,73	3,61
				5,0	99,7	100,2	0,95	1,14
				50,0	100,9	100,0	1,00	1,72
SMZ	0,23 (0,16-0,29)	0,46 (0,33-0,57)	0,74 (0,54-0,92)	1,0	100,9	99,5	1,84	2,51
				5,0	100,4	100,5	0,72	0,90
				50,0	100,0	100,3	1,04	1,19
SMX	0,22 (0,17-0,28)	0,45 (0,34-0,55)	0,73 (0,56-0,89)	1,0	100,7	102,5	1,92	2,38
				5,0	100,4	100,4	0,70	0,81
				50,0	100,0	99,4	1,02	1,66

*Die Bestimmungsgrenze wurde für alle Analyte auf 1 µg kg⁻¹ normiert.

4.2.3 Verfahrenskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Möhren

Tabelle 4-6: Validierungskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Möhrenrüben.

Validierungsdaten für Möhrenrüben								
Analyt	NG, EG, BG nach DIN 32645 [µg kg ⁻¹]			Dotierung [µg kg ⁻¹] (n = 10)	relative WDF [%]		V _K [%]	
	X _{NG} (n = 3)	X _{EG} (n = 3)	X _{BG} * (n = 3)		intraday (1 Tag)	interday (3 Tage)	intraday (1 Tag)	interday (3 Tage)
(Epi)-CTC	0,08 (0,06-0,10)	0,16 (0,12-0,19)	0,26 (0,20-0,31)	0,5	101,8	102,6	3,13	5,73
				25,0	100,8	100,6	1,05	1,32
				50,0	100,9	100,0	1,21	2,18
(Epi)-iso-CTC	0,09 (0,08-0,10)	0,17 (0,15-0,20)	0,29 (0,25-0,32)	0,5	100,0	100,5	1,63	5,12
				25,0	101,8	101,7	1,43	1,63
				50,0	98,9	100,1	2,79	2,14
(Epi)-DOX	0,08 (0,06-0,11)	0,16 (0,12-0,21)	0,26 (0,20-0,34)	0,5	102,4	102,1	2,88	3,78
				25,0	101,2	102,0	1,15	2,02
				50,0	100,9	100,6	0,91	1,13
N-Acetyl-SMZ	0,10 (0,08-0,11)	0,20 (0,16-0,22)	0,33 (0,27-0,36)	0,5	97,4	97,9	3,88	4,68
				25,0	99,6	100,2	1,50	2,42
				50,0	101,0	100,9	1,75	1,76
N-Acetyl-SMX	0,09 (0,07-0,11)	0,19 (0,14-0,22)	0,31 (0,23-0,35)	0,5	99,0	104,1	4,18	8,99
				25,0	98,2	100,3	2,88	2,78
				50,0	100,6	101,9	1,84	2,41
SMZ	0,09 (0,07-0,11)	0,18 (0,15-0,23)	0,30 (0,24-0,37)	0,5	100,4	98,7	2,94	5,12
				25,0	100,4	100,9	1,35	1,58
				50,0	100,9	100,8	1,43	1,75
SMX	0,10 (0,09-0,13)	0,21 (0,18-0,25)	0,34 (0,29-0,41)	0,5	97,6	100,6	3,96	3,98
				25,0	100,3	99,9	1,21	1,42
				50,0	100,6	100,3	0,52	1,16

Tabelle 4-7: Validierungskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Möhrenschaalen.

Validierungsdaten für Möhrenschaalen								
Analyt	NG, EG, BG nach DIN 32645 [µg kg ⁻¹]			Dotierung [µg kg ⁻¹] (n = 10)	relative WDF [%]		V _K [%]	
	X _{NG} (n = 3)	X _{EG} (n = 3)	X _{BG} * (n = 3)		intraday (1 Tag)	interday (3 Tage)	intraday (1 Tag)	interday (3 Tage)
(Epi)-CTC	0,10 (0,09-0,10)	0,18 (0,17-0,19)	0,30 (0,28-0,32)	0,5	102,4	102,9	4,20	4,11
				25,0	101,1	100,4	2,12	2,32
				50,0	101,4	101,1	1,05	1,55
(Epi)-iso-CTC	0,06 (0,13-0,23)	0,13 (0,09-0,15)	0,21 (0,15-0,25)	0,5	103,4	101,7	4,08	3,71
				25,0	103,1	102,2	2,28	2,34
				50,0	101,8	101,8	1,56	1,86
(Epi)-DOX	0,08 (0,17-0,36)	0,16 (0,11-0,19)	0,26 (0,19-0,31)	0,5	102,4	102,1	3,16	3,07
				25,0	101,1	101,9	3,74	2,85
				50,0	99,9	101,1	1,51	2,06
N-Acetyl-SMZ	0,09 (0,08-0,10)	0,17 (0,16-0,20)	0,28 (0,26-0,33)	0,5	100,2	101,2	2,39	2,47
				25,0	103,1	102,9	2,08	3,23
				50,0	104,1	105,3	2,12	2,68
N-Acetyl-SMX	0,07 (0,05-0,09)	0,14 (0,10-0,17)	0,23 (0,18-0,28)	0,5	99,6	99,9	6,68	4,92
				25,0	100,4	101,6	2,12	2,29
				50,0	105,6	104,9	1,40	1,56
SMZ	0,09 (0,06-0,11)	0,17 (0,12-0,22)	0,28 (0,20-0,36)	0,5	100,4	103,3	2,79	3,53
				25,0	100,9	100,9	2,01	1,50
				50,0	100,0	101,3	1,03	1,51
SMX	0,09 (0,07-0,11)	0,18 (0,14-0,22)	0,29 (0,24-0,35)	0,5	100,2	102,5	3,04	3,65
				25,0	100,0	99,8	2,43	1,89
				50,0	100,7	101,4	1,20	1,75

*Die Bestimmungsgrenze wurde für alle Analyte auf 0,5 µg kg⁻¹ normiert.

Tabelle 4-8: Validierungskennndaten für den Nachweis von Antibiotika in Möhrenwurzeln.

Validierungsdaten für Möhrenwurzeln								
Analyt	NG, EG, BG nach DIN 32645 [µg kg ⁻¹]			Dotierung [µg kg ⁻¹] (n = 10)	relative WDF [%]		V _K [%]	
	X _{NG} (n = 3)	X _{EG} (n = 3)	X _{BG} * (n = 3)		intraday (1 Tag)	interday (3 Tage)	intraday (1 Tag)	interday (3 Tage)
(Epi)-CTC	0,07 (0,06-0,08)	0,14 (0,12-0,17)	0,24 (0,20-0,28)	0,5	99,2	100,3	3,04	3,10
				25,0	100,2	101,2	2,92	2,30
				50,0	100,3	101,2	1,27	1,50
(Epi)-iso-CTC	0,07 (0,05-0,08)	0,13 (0,11-0,15)	0,22 (0,18-0,26)	0,5	105,6	102,1	2,87	3,62
				25,0	102,5	102,1	2,56	2,23
				50,0	101,2	100,7	0,89	1,28
(Epi)-DOX	0,08 (0,08-0,09)	0,17 (0,16-0,18)	0,28 (0,26-0,30)	0,5	98,4	99,6	2,68	2,50
				25,0	102,6	102,3	2,64	2,41
				50,0	100,9	100,9	0,99	1,36
N-Acetyl-SMZ	0,06 (0,05-0,08)	0,12 (0,10-0,15)	0,21 (0,17-0,25)	0,5	99,6	100,7	3,87	4,19
				25,0	101,3	100,7	1,79	1,98
				50,0	101,7	101,1	1,27	1,80
N-Acetyl-SMX	0,05 (0,04-0,05)	0,10 (0,08-0,11)	0,16 (0,14-0,18)	0,5	99,8	100,7	3,05	2,92
				25,0	100,7	99,4	2,81	2,81
				50,0	100,6	100,3	1,79	1,57
SMZ	0,06 (0,03-0,08)	0,12 (0,07-0,15)	0,19 (0,11-0,25)	0,5	102,4	103,1	6,43	5,51
				25,0	98,9	99,1	2,26	2,13
				50,0	100,7	100,2	0,68	1,14
SMX	0,08 (0,07-0,09)	0,16 (0,13-0,18)	0,26 (0,22-0,29)	0,5	101,4	99,7	3,73	3,28
				25,0	99,8	100,2	1,88	1,81
				50,0	100,7	100,3	1,36	1,23

*Die Bestimmungsgrenze wurde für alle Analyte auf 0,5 µg kg⁻¹ normiert.

Tabelle 4-9: Validierungskennndaten für den Nachweis von Antibiotika im Möhrengrün.

Validierungsdaten für Möhrengrün								
Analyt	NG, EG, BG nach DIN 32645 [µg kg ⁻¹]			Dotierung [µg kg ⁻¹] (n = 10)	relative WDF [%]		V _K [%]	
	X _{NG} (n = 3)	X _{EG} (n = 3)	X _{BG} * (n = 3)		intraday (1 Tag)	interday (3 Tage)	intraday (1 Tag)	interday (3 Tage)
(Epi)-CTC	0,31 (0,25-0,34)	0,62 (0,49-0,68)	1,02 (0,82-1,19)	2,0	99,2	100,0	4,17	3,60
				25,0	102,8	101,5	2,75	3,65
				50,0	101,1	100,3	2,72	2,69
(Epi)-iso-CTC	0,34 (0,31-0,36)	0,68 (0,62-0,72)	1,12 (1,04-1,19)	2,0	102,3	101,9	4,01	3,43
				25,0	102,5	103,5	3,92	3,87
				50,0	103,3	101,9	1,75	2,33
(Epi)-DOX	0,29 (0,27-0,31)	0,57 (0,54-0,63)	0,95 (0,89-1,04)	2,0	102,4	99,8	2,32	3,10
				25,0	101,6	103,5	2,78	2,93
				50,0	101,9	100,6	2,15	3,93
N-Acetyl-SMZ	0,41 (0,28-0,50)	0,82 (0,57-1,00)	1,37 (0,95-1,61)	2,0	94,8	95,5	3,57	3,18
				25,0	103,5	101,3	6,75	6,01
				50,0	103,5	102,2	5,87	6,91
N-Acetyl-SMX	0,43 (0,27-0,67)	0,86 (0,55-1,34)	1,40 (0,91-2,13)	2,0	97,7	97,6	7,45	6,15
				25,0	96,6	98,1	7,24	5,73
				50,0	100,3	101,4	5,17	5,90
SMZ	0,33 (0,25-0,37)	0,68 (0,51-0,79)	1,08 (0,85-1,22)	2,0	107,0	106,4	4,30	3,66
				25,0	103,9	103,7	2,50	3,34
				50,0	100,7	99,3	2,35	3,46
SMX	0,29 (0,21-0,36)	0,58 (0,43-0,72)	0,96 (0,72-1,19)	2,0	100,8	101,6	3,85	4,04
				25,0	103,6	103,2	3,39	4,56
				50,0	99,0	100,4	2,81	3,08

*Die Bestimmungsgrenze wurde für alle Analyte auf 2,0 µg kg⁻¹ normiert.

4.2.4 Verfahrenskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Boden

Tabelle 4-10: Validierungskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Sandboden.

Validierungsdaten für Volkmarser Sandboden								
Analyt	NG, EG, BG nach DIN 32645 [µg kg ⁻¹]			Dotierung [µg kg ⁻¹] (n = 10)	relative WDF [%]		V _K [%]	
	X _{NG} (n = 3)	X _{EG} (n = 3)	X _{BG} * (n = 3)		intraday (1 Tag)	interday (3 Tage)	intraday (1 Tag)	interday (3 Tage)
(Epi)-CTC	0,10 (0,07-0,16)	0,20 (0,13-0,31)	0,34 (0,22-0,52)	1	99,2	99,0	5,62	9,92
				250	99,2	100,1	2,76	1,91
				500	100,0	100,6	0,90	1,69
(Epi)-iso-CTC	0,12 (0,08-0,14)	0,24 (0,18-0,31)	0,40 (0,31-0,51)	1	99,2	104,4	6,19	6,46
				250	101,4	100,9	1,05	1,29
				500	100,3	100,6	0,77	1,20
(Epi)-DOX	0,11 (0,09-0,12)	0,21 (0,18-0,23)	0,36 (0,31-0,39)	1	104,1	104,2	3,50	5,24
				250	100,4	100,7	0,65	1,21
				500	100,9	100,9	0,88	1,41
N-Acetyl-SMZ	0,14 (0,12-0,16)	0,28 (0,23-0,32)	0,46 (0,39-0,54)	1	107,1	109,6	4,30	4,45
				250	100,6	100,3	1,58	1,58
				500	100,6	100,8	0,82	1,43
N-Acetyl-SMX	0,12 (0,10-0,14)	0,23 (0,19-0,27)	0,39 (0,33-0,45)	1	99,4	94,2	9,89	8,67
				250	101,4	101,2	1,10	1,40
				500	100,7	101,0	0,53	1,43
SMZ	0,11 (0,10-0,12)	0,22 (0,19-0,25)	0,37 (0,33-0,41)	1	101,2	100,6	2,94	4,78
				250	100,7	100,4	2,28	1,23
				500	100,4	100,5	0,89	0,87
SMX	0,10 (0,08-0,14)	0,21 (0,17-0,27)	0,34 (0,28-0,45)	1	100,1	100,0	4,75	5,72
				250	100,7	100,7	1,49	1,59
				500	100,4	100,6	1,03	1,36

Tabelle 4-11: Validierungskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Lößboden.

Validierungsdaten für Baunataler Lößboden								
Analyt	NG, EG, BG nach DIN 32645 [µg kg ⁻¹]			Dotierung [µg kg ⁻¹] (n = 10)	relative WDF [%]		V _K [%]	
	X _{NG} (n = 3)	X _{EG} (n = 3)	X _{BG} * (n = 3)		intraday (1 Tag)	interday (3 Tage)	intraday (1 Tag)	interday (3 Tage)
(Epi)-CTC	0,14 (0,12-0,16)	0,28 (0,23-0,32)	0,46 (0,39-0,53)	1	101,9	97,6	5,38	9,69
				250	101,2	100,4	1,44	1,61
				500	102,0	100,7	1,10	1,54
(Epi)-iso-CTC	0,17 (0,13-0,23)	0,34 (0,26-0,45)	0,56 (0,43-0,74)	1	111,9	103,8	5,18	9,41
				250	100,8	101,0	1,46	1,25
				500	100,7	100,5	1,62	1,22
(Epi)-DOX	0,25 (0,17-0,36)	0,50 (0,35-0,71)	0,80 (0,57-1,12)	1	97,8	95,6	3,37	10,08
				250	101,1	101,1	1,13	1,46
				500	100,7	101,0	1,08	1,17
N-Acetyl-SMZ	0,15 (0,10-0,20)	0,30 (0,19-0,40)	0,50 (0,32-0,65)	1	105,0	102,4	4,21	5,99
				250	100,2	99,9	1,59	1,36
				500	100,4	100,7	0,76	1,69
N-Acetyl-SMX	0,15 (0,10-0,19)	0,30 (0,21-0,37)	0,50 (0,35-0,61)	1	108,3	101,5	7,34	8,81
				250	101,7	101,0	0,95	1,27
				500	101,3	101,1	0,79	0,94
SMZ	0,16 (0,13-0,20)	0,31 (0,26-0,40)	0,52 (0,44-0,65)	1	100,2	100,5	3,55	4,38
				250	100,9	101,0	1,20	1,27
				500	100,5	100,9	0,79	1,34
SMX	0,16 (0,11-0,23)	0,32 (0,22-0,46)	0,53 (0,36-0,75)	1	106,0	102,7	6,13	5,84
				250	100,4	100,6	1,15	1,15
				500	100,9	100,8	0,81	0,90

*Die Bestimmungsgrenze wurde für alle Analyte auf 1 µg kg⁻¹ normiert.

4.2.5 Verfahrenskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Wasser

Tabelle 4-12: Validierungskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Bodeneluaten.

Validierungsdaten für Bodeneluat (AutoTrace)								
Analyt	NG, EG, BG nach DIN 32645 [ng L ⁻¹]			Dotierung [ng L ⁻¹] (n = 10)	relative WDF [%]		V _K [%]	
	X _{NG} (n = 3)	X _{EG} (n = 3)	X _{BG} * (n = 3)		intraday (1 Tag)	interday (3 Tage)	intraday (1 Tag)	interday (3 Tage)
(Epi)-CTC	0,09 (0,08-0,10)	0,18 (0,16-0,20)	0,30 (0,28-0,34)	1	99,9	98,0	4,76	6,44
				500	99,7	100,1	1,26	1,07
				1000	100,9	101,5	1,63	1,91
(Epi)-iso-CTC	0,10 (0,06-0,14)	0,19 (0,12-0,28)	0,33 (0,22-0,47)	1	109,1	103,3	4,63	5,11
				500	100,4	100,7	0,88	1,09
				1000	101,9	102,5	1,87	1,75
(Epi)-DOX	0,09 (0,05-0,11)	0,17 (0,10-0,22)	0,29 (0,17-0,37)	1	103,5	102,6	6,25	5,18
				500	99,8	100,4	0,95	1,10
				1000	102,4	103,2	1,83	2,57
N-Acetyl-SMZ	0,14 (0,11-0,20)	0,28 (0,21-0,40)	0,46 (0,36-0,66)	1	100,2	100,3	5,84	5,52
				500	102,2	101,3	2,19	1,66
				1000	103,6	103,3	2,09	2,58
N-Acetyl-SMX	0,11 (0,07-0,16)	0,22 (0,13-0,32)	0,37 (0,22-0,53)	1	94,3	100,5	9,66	8,54
				500	101,5	101,2	1,49	1,42
				1000	100,4	100,8	1,14	2,38
SMZ	0,11 (0,08-0,18)	0,23 (0,16-0,35)	0,38 (0,27-0,58)	1	96,4	101,0	2,69	4,81
				500	100,1	100,6	0,81	0,91
				1000	100,5	101,1	2,00	1,74
SMX	0,11 (0,08-0,15)	0,21 (0,17-0,29)	0,36 (0,28-0,49)	1	104,3	100,4	3,56	4,02
				500	100,0	100,4	1,15	1,13
				1000	99,3	100,7	0,93	1,85

*Die BG wurde für alle Analyte auf 1 ng L⁻¹ normiert. Die Validierungskenndaten wurden mit unbelastetem Lysimeterwasser erhoben.

Tabelle 4-13: Validierungskenndaten für den Nachweis von Antibiotika in Grundwasser.

Validierungsdaten für Grundwasser (Direktinjektion)								
Analyt	NG, EG, BG nach DIN 32645 [ng L ⁻¹]			Dotierung [ng L ⁻¹] (n = 10)	relative WDF [%]		V _K [%]	
	X _{NG} (n = 3)	X _{EG} (n = 3)	X _{BG} * (n = 3)		intraday (1 Tag)	interday (3 Tage)	intraday (1 Tag)	interday (3 Tage)
(Epi)-CTC	15,7 (13,9-16,1)	31,4 (26,9-35,5)	50,0 (44,7-51,1)	50	101,0	97,5	6,87	10,13
				250	102,4	101,0	2,38	2,89
				500	103,4	102,5	2,65	2,77
(Epi)-iso-CTC	17,7 (12,6-23,1)	35,3 (25,1-46,1)	55,6 (40,6-71,4)	50	100,5	100,6	6,50	5,69
				250	101,1	100,8	4,22	3,41
				500	102,3	101,1	1,77	2,12
(Epi)-DOX	15,3 (13,5-17,7)	30,6 (26,9-35,5)	48,9 (43,4-56,0)	50	105,2	103,4	6,70	5,43
				250	101,7	101,5	2,78	2,22
				500	101,4	101,6	1,32	1,71
N-Acetyl-SMZ	15,3 (13,6-16,9)	30,6 (27,3-33,8)	48,8 (43,9-53,6)	50	94,6	98,1	8,20	6,66
				250	98,7	100,3	5,37	5,97
				500	103,7	103,3	2,41	2,42
N-Acetyl-SMX	11,9 (10,1-15,3)	23,7 (20,2-30,6)	38,4 (33,1-48,9)	50	102,9	103,0	5,76	7,34
				250	102,8	101,4	2,28	4,47
				500	103,3	102,8	1,23	1,92
SMZ	12,8 (11,2-15,9)	25,6 (22,3-31,9)	41,3 (36,4-50,7)	50	102,9	103,2	4,47	4,96
				250	101,7	101,4	1,72	1,48
				500	101,5	103,0	1,43	2,15
SMX	12,4 (9,3-15,6)	24,9 (18,5-31,2)	40,1 (30,5-49,7)	50	97,7	98,8	2,56	4,15
				250	100,3	101,3	2,06	2,59
				500	99,8	100,8	1,33	1,71

Die BG wurde für alle Analyte auf 50 ng L⁻¹ normiert. Die Validierungskenndaten wurden mit unbelastetem Grundwasser erhoben.

4.3 Aufwuchsversuche in Mitscherlichgefäßen

Das Ziel der Aufwuchsversuche bestand darin, den möglichen Transfer von Antibiotika in Pflanzen (Deutsches Weidelgras und Möhren) zu untersuchen, nachdem antibiotikahaltige Gülle als Düngemittel eingesetzt wurde. Die Untersuchungen eines Aufwuchsprojektes umfassten neben der Analyse des Pflanzenmaterials auch die Untersuchung der dotierten Rindergülle nach deren Vorbehandlung. Zudem erfolgte die Analyse der Bodenproben nach der Ernte der Pflanzen. Anhand der Daten wurden die Transferraten der Antibiotika aus dem Gülle-Boden-Gemisch in die Pflanzen ermittelt.

4.3.1 Untersuchung des Weidelgrasaufwuchses

4.3.1.1 Untersuchung der Grasproben

Eine detaillierte Beschreibung der Versuchsdurchführung mit einer tabellarischen Auflistung der Versuchsansätze ist **Kapitel 3.6.2** zu entnehmen. Die Analyse der Weidelgrasproben auf Antibiotikarückstände erfolgte in Dreifachbestimmung unter Verwendung der zerkleinerten und homogenisierten Weidelgrasfrischmasse. Nach entsprechender Probenvorbereitung (**Kapitel 3.10.4.1**) wurden die Proben mittels LC-MS/MS analysiert. Da die Grasschnitte je nach Ernteschnitt sichtbar unterschiedliche Wassergehalte besaßen, wurde von jeder Einzelprobe und Variante die Trockenmasse in Doppelbestimmung ermittelt (**Kapitel 3.5**). Alle Ergebnisse wurden auf die Trockenmasse umgerechnet.

Begonnen wurde mit der Untersuchung der Varianten, welche mit Rindergülle gedüngt wurden, die vor der Fermentation mit 100 mg Antibiotikum je kg angereichert wurde. **Abbildung 4-16** gibt einen Überblick über die gefundenen Antibiotikakonzentrationen in den „100 mg kg⁻¹“-Versuchsansätzen. Von den vier zugesetzten Antibiotika konnte Sulfamethazin in den Weidelgrasproben nachgewiesen werden. Es ergaben sich Konzentrationsunterschiede zwischen Weidelgrasproben die auf Sandboden kultiviert wurden und vergleichbaren Ansätzen mit Lößboden. Die Ansätze mit Sandboden wiesen höhere Gehalte an Sulfamethazin auf. Im ersten Schnitt betrug die Konzentration 217,9 µg kg_{TM}⁻¹. In Versuchsansätzen mit Lößboden betrug die nachgewiesene Konzentration im ersten Schnitt 86,1 µg kg_{TM}⁻¹. Mit jedem weiteren Schnitt, und damit im zeitlichen Verlauf, nahm die Sulfamethazinkonzentration im Weidelgras ab.

Neben den vier dotierten Antibiotika wurde das Weidelgras auch auf mögliche Metabolite und Transformationsprodukte untersucht. Hierzu zählten *N*-Acetyl-Sulfamethazin, *N*-Acetyl-Sulfamethoxazol und (Epi)-iso-Chlortetracyclin. Neben Sulfamethazin konnte auch der Metabolit *N*-Acetyl-Sulfamethazin in den Weidelgrasproben quantifiziert werden.

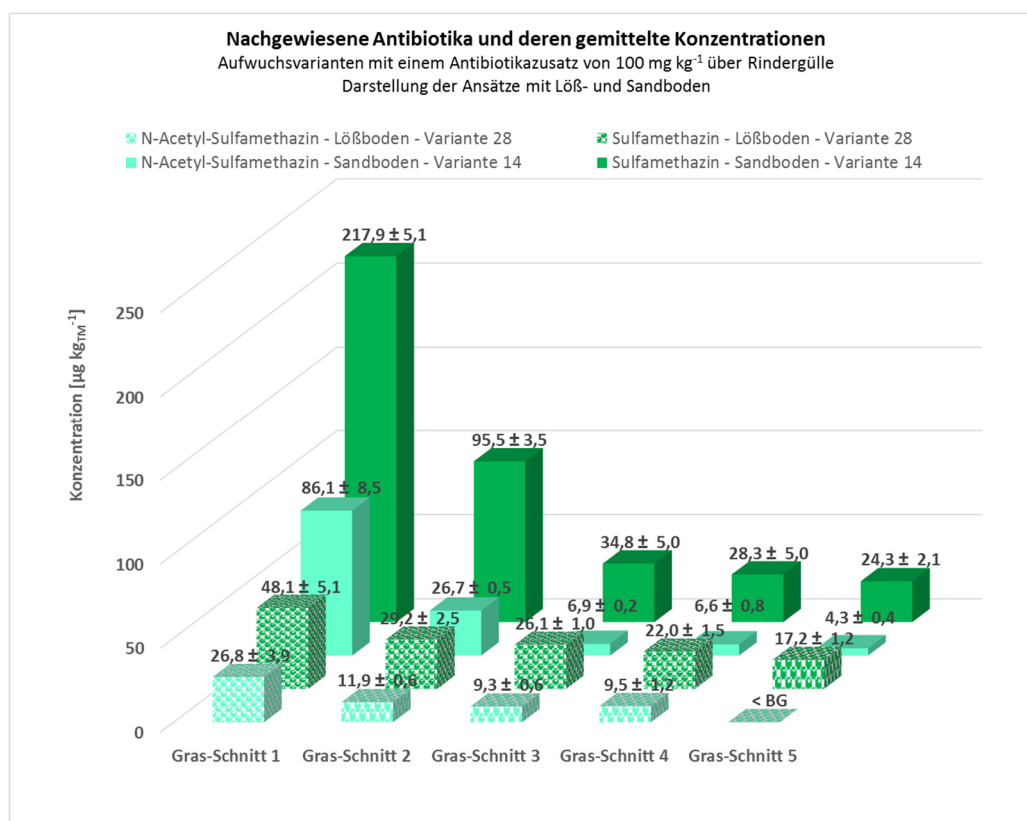


Abbildung 4-16: Darstellung der nachgewiesenen Antibiotika in den Weidelgrasproben des Ansatzes mit einem 100 mg-Zusatz an Sulfamethazin pro kg Gülle. Aufgeführt sind die gemittelten Konzentrationen in µg kg⁻¹ Trockenmasse ± der Standardabweichung (n = 3).¹⁴

Da der 100 mg kg⁻¹-Ansatz für Sulfamethazin positive Befunde lieferte, wurden zusätzlich die Varianten analysiert, welche mit Gülle gedüngt wurden, die 20 mg und 50 mg Sulfamethazin pro kg enthielt. Die anderen 100 mg kg⁻¹-Ansätze wiesen weder Chlortetracyclin und Doxycyclin noch Sulfamethoxazol in quantifizierbaren Mengen auf, weshalb bei diesen Analyten auf die weitere Analyse der Varianten mit niedrigeren Konzentrationen verzichtet wurde.

Auch in Weidelgrasproben, welche mit Gülle gedüngt wurden, die mit 50 mg Sulfamethazin je kg Gülle dotiert wurde, konnte Sulfamethazin quantitativ bestimmt werden (**Abbildung 4-17**). Die Konzentrationen lagen bei Ansätzen mit Sandboden im Verlauf der Aufwuchsperiode zwischen 48,6 µg kg_{TM}⁻¹ und 7,6 µg kg_{TM}⁻¹. Auch hier nahm die Konzentration mit jedem weiteren Schnitt ab. Neben Sulfamethazin war im ersten und zweiten Schnitt auch *N*-Acetyl-Sulfamethazin nachweisbar. Die Konzentration betrug 25,9 µg kg_{TM}⁻¹ im ersten und 5,9 µg kg_{TM}⁻¹ im zweiten Schnitt. In den weiteren Schnitten lagen die Gehalte des Metaboliten unterhalb der Bestimmungsgrenze von 1 µg kg⁻¹. Versuchsansätze mit Lößboden wiesen etwas niedrigere Sulfamethazingehalte im Bereich von 17,2 µg kg_{TM}⁻¹ bis 9,1 µg kg_{TM}⁻¹ auf. *N*-Acetyl-Sulfamethazin war nicht nachweisbar. **Abbildung 4-17** gibt einen Überblick über die gefundenen Antibiotika und deren gemittelte Konzentrationen in den „50 mg kg⁻¹“-Versuchsansätzen.

¹⁴ Definition des Begriffes „n-Zahl“ in der vorliegenden Arbeit: Anzahl aller Einzelmessungen, die zur Bildung des arithmetischen Mittelwertes herangezogen wurden.

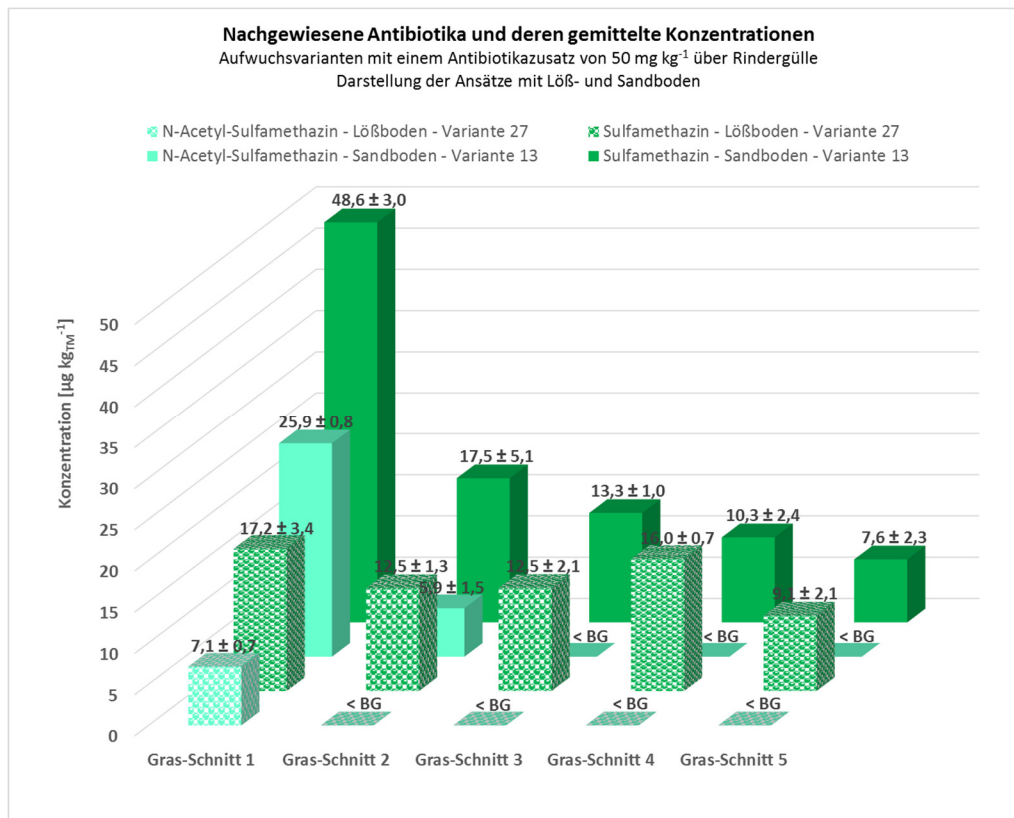


Abbildung 4-17: Darstellung der nachgewiesenen Antibiotika in den Weidelgrasproben des Ansatzes mit einem 50 mg-Zusatz an Sulfamethazin pro kg Gülle. Aufgeführt sind die gemittelten Konzentrationen in $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ Trockenmasse \pm der Standardabweichung ($n = 3$).

Die Untersuchung der Weidelgrasproben, welche mit Gülle gedüngt wurden, die 20 mg Sulfamethazin je kg enthielt, wiesen in Varianten welche auf Sandboden wuchsen Sulfamethazinbefunde auf. Die gefundenen Konzentrationen lagen im Bereich von $15,4 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ bis $4,7 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$. In Varianten mit Lößboden konnte kein Sulfamethazin nachgewiesen werden. Der Metabolit *N*-Acetyl-Sulfamethazin war weder in Ansätzen mit Sandboden, noch in Ansätzen mit Lößboden nachweisbar. **Abbildung 4-18** gibt einen Überblick über die ermittelten Antibiotikakonzentrationen in den „20 mg kg⁻¹“- Versuchsansätzen.

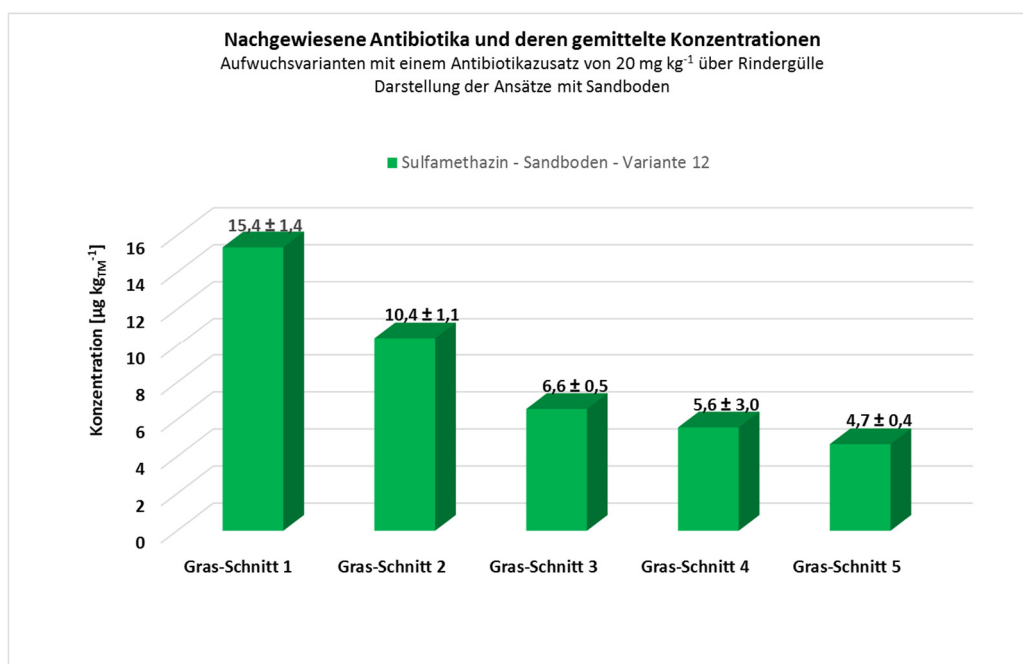


Abbildung 4-18: Darstellung der nachgewiesenen Antibiotika in den Weidelgrasproben des Ansatzes mit einem 20 mg-Zusatz an Sulfamethazin pro kg Gülle. Aufgeführt sind die gemittelten Konzentrationen in $\mu\text{g kg}^{-1}$ Trockenmasse \pm der Standardabweichung ($n = 3$).

Tabelle B-1 und **Tabelle B-2** fassen die gefundenen Antibiotika und deren gemittelte Gehalte in den untersuchten Weidelgrasproben zusammen. Die Messergebnisse sind auf Frisch- und Trockenmasse bezogen aufgeführt, unter Angabe der Standardabweichung und der Spannweite. Die Kontrollansätze (Variante 1, 2, 15 und 16), welche ohne Gülle bzw. mit undotierter Gülle kultiviert wurden, wurden ebenfalls untersucht und waren frei von Antibiotika. Sie dienen zum Ansetzen der Matrixkalibrierung.

Gegenüberstellung der Sulfamethazingehalte bezogen auf Frisch- und Trockenmasse am Beispiel der Varianten mit Sandboden

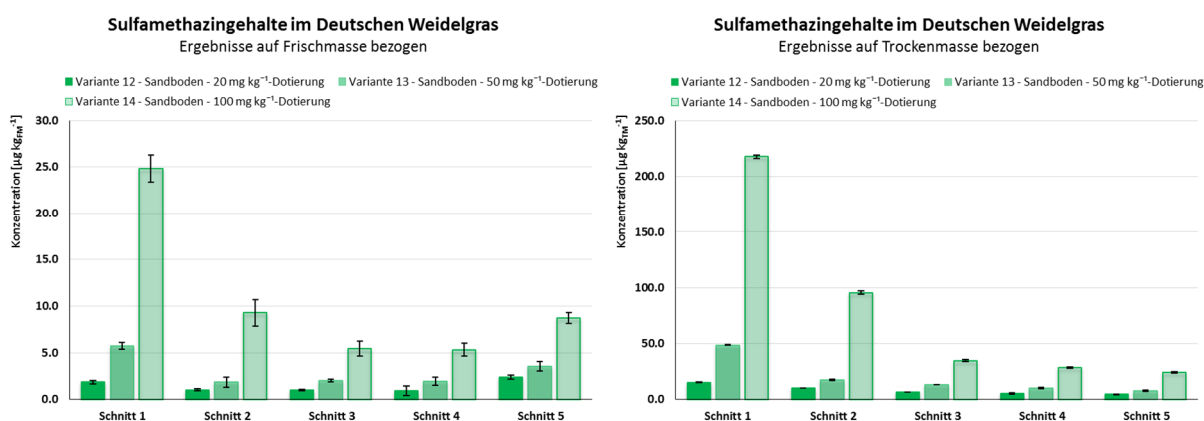


Abbildung 4-19: Gegenüberstellung der gefundenen Sulfamethazingehalte in Bezug auf die Frisch- und Trockenmasse.

Abbildung 4-19 verdeutlicht, dass der Bezug der Ergebnisse auf die Trockenmasse entscheidend ist um eine Aussage darüber treffen zu können, ob der Antibiotikagehalt mit jedem weiteren Schnitt abnimmt, ansteigt oder stagniert. Eine reine Beziehung auf Frischmasse erweckt den Anschein, als würde die Antibiotikakonzentration zunächst abfallen und dann wieder ansteigen. Durch das Einbeziehen der Trockenmasse ist eine Abnahme der Antibiotikakonzentration mit jedem Schnitt zu erkennen.

4.3.1.2 Untersuchung der Rindergülle nach durchgeführter Fermentation

Die Bestimmung des Antibiotikagehaltes in der Rindergülle wurde nach durchgeführter Fermentation vorgenommen. Die Probenaufarbeitung ist in **Kapitel 3.10.4.1** beschrieben. Aufgrund des erwartungsgemäß hohen Antibiotikagehaltes wurden alle Güllen zunächst in Dreifachbestimmung über eine vorherige Verdünnung des Probenextraktes (1:100) analysiert. War der Nachweis negativ, dies traf lediglich auf Gülleansätze mit Sulfamethoxazolzusatz zu, wurde der Probenextrakt über Festphasenextraktion angereichert und erneut gemessen. Die ermittelten Gehalte sind in **Abbildung 4-20** auf Frischmasse bezogen angegeben.

Die Fermentation der Rindergülle erfolgte über einen Zeitraum von 35 Tagen unter anaeroben Bedingungen (vgl. **Kapitel 3.6.2.2**) und führte zu einer Konzentrationsabnahme aller vier dotierten Antibiotika (**Tabelle B-3**). Je nach Antibiotikum war diese Abnahme unterschiedlich. Das Sulfonamid Sulfamethoxazol war nach der Fermentation nicht mehr in der Gülle nachweisbar, während Sulfamethazin je nach Fermentationsansatz (20, 50, 100 mg kg⁻¹-Zusatz) eine Eliminationsrate von 25 % bis 29 % zeigte. Die Konzentration an (Epi)-Chlortetracyclin nahm um 62 % bis 78 % ab. Mit der Abnahme der (Epi)-Chlortetracyclinkonzentration im Fermentationsansatz, kam es jedoch zu einer Bildung der Isoform (**Tabelle B-4** und **Abbildung 4-21**). Die Umwandlung von (Epi)-Chlortetracyclin in (Epi)-iso-Chlortetracyclin erfolgt unter basischen Bedingungen (vgl. **Kapitel 5.2.1**). (Epi)-Doxycyclin unterlag einer Konzentrationsabnahme von 17 % bis 23 %. Die Abnahme der Antibiotikakonzentration kann durch verschiedene Prozesse hervorgerufen werden. Die Ursprungssubstanzen könnten beispielsweise einem Zerfall/Abbau (biotisch, abiotisch) unterliegen oder an Matrixbestandteile sorbieren. Nähere Ausführungen hierzu sind **Kapitel 5.2.1** zu entnehmen. Für (Epi)-Chlortetracyclin konnte dessen Isoform als Transformationsprodukt identifiziert und quantifiziert werden, weshalb in diesem Fall von einem irreversiblen Isomerisationsprodukt gesprochen werden kann.

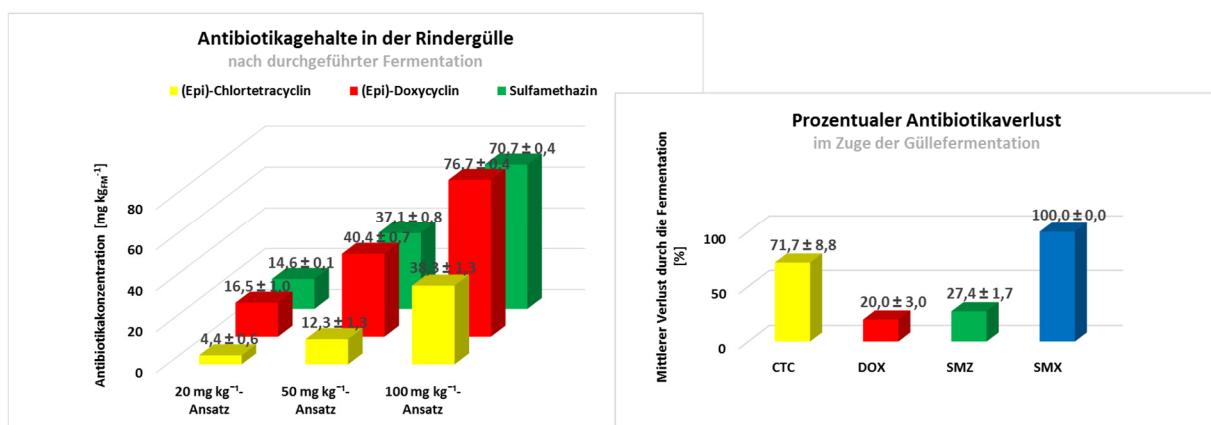


Abbildung 4-20: Antibiotikagehalte in der Rindergülle nach durchgeführter Fermentation mit Angabe der gemittelten Verluste in Prozent \pm der Standardabweichung ($n = 3$).

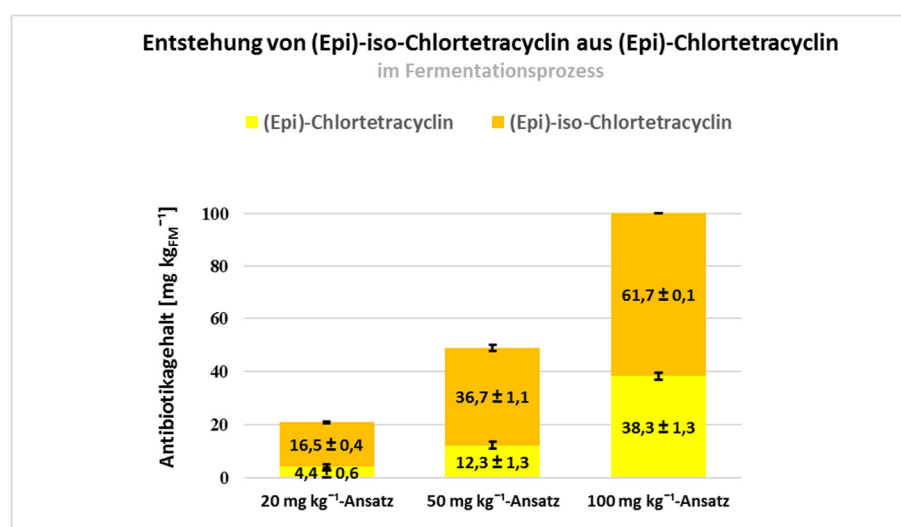


Abbildung 4-21: Entstehung von (Epi)-iso-Chlortetracyclin aus (Epi)-Chlortetracyclin durch den Fermentationsprozess. Aufgeführt sind die Mittelwerte der gefundenen Antibiotika in mg kg⁻¹ Frischmasse \pm der Standardabweichung ($n = 3$).

4.3.1.3 Untersuchung der Bodenproben nach der Ernte der Pflanzen

Zur Untersuchung der Bodenproben wurde der Inhalt der Mitscherlichgefäße nach der Ernte der Pflanzen in ein großes Gefäß entleert, händisch sorgfältig homogenisiert und eine Teilprobe für die Analyse im Labor entnommen. Diese Vorgehensweise der Probenahme entspricht der gängigen Praxis im Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen für die dort durchgeführten Gefäßversuche. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach **Kapitel 3.10.4.2** in Doppelbestimmung. Die Gehalte sind auf Frisch- und Trockenmasse bezogen angegeben. Die Ergebnisse der Trockenmassebestimmung sind im Anhang aufgeführt.

Da Sulfamethoxazol während des Fermentationsprozesses der Gülle abgebaut wird (vgl. **Kapitel 4.3.1.2**) ist dieses Antibiotikum nicht mehr im Boden nachweisbar.

Abbildung 4-22 zeigt die nachgewiesenen mittleren Antibiotikagehalte im Volkmarser Sandboden. Lediglich 38,7 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ bis 130,7 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ (Epi)-Chlortetracyclin waren je nach Versuchsansatz nach der Ernte der Pflanzen im Boden vorhanden. Der (Epi)-Doxycyclingehalt im Boden lag zwischen 105,5 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ und 534,3 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ und war somit am höchsten. Von dem Sulfonamid Sulfamethazin verblieben nach der Ernte noch 36,0 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ bis 215,6 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ im Versuchsboden.

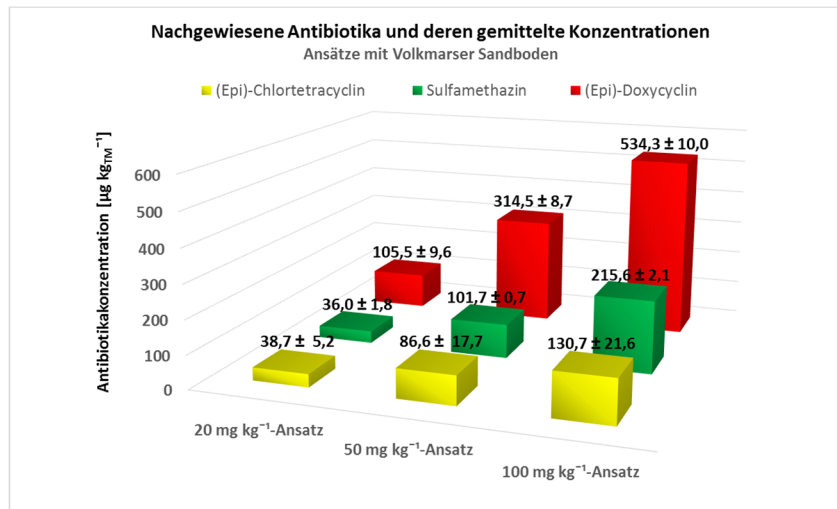


Abbildung 4-22: Darstellung der gefundenen Antibiotika in den „Volkmarser Sand“-Bodenproben nach der Ernte der Pflanzen. Aufgeführt sind die Mittelwerte der gefundenen Antibiotika in $\mu\text{g kg}^{-1}$ Trockenmasse \pm der Standardabweichung ($n = 2$).¹⁵

Im Lößboden waren nach der Ernte (Epi)-Chlortetracyclin, (Epi)-Doxycyclin und Sulfamethazin nachweisbar. Die Gehalte lagen allerdings deutlich unter den Konzentrationen, welche im Sandboden bestimmt wurden (**Abbildung 4-23**). Auch hier war der Gehalt an (Epi)-Doxycyclin am höchsten.

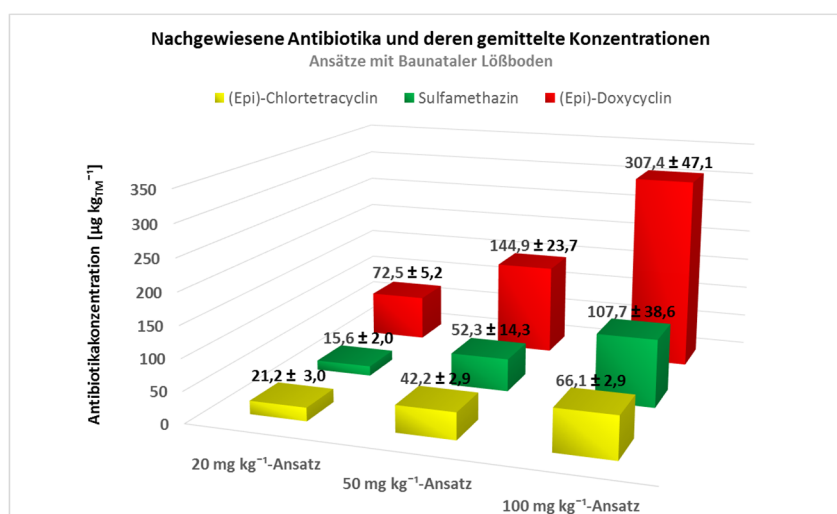


Abbildung 4-23: Darstellung der gefundenen Antibiotika in den „Baunataler Löß“-Bodenproben nach der Ernte der Pflanzen. Aufgeführt sind die Mittelwerte der gefundenen Antibiotika in $\mu\text{g kg}^{-1}$ Trockenmasse \pm der Standardabweichung ($n = 2$).

¹⁵ Bei $n = 2$ wurde die Standardabweichung nach folgender Formel berechnet: $s = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{2}}$.

Eine Zusammenfassung der im Boden verbliebenen Antibiotikarückstände mit Angabe der Standardabweichung sind in **Tabelle B-5** aufgeführt. Neben (Epi)-Chlortetracyclin war in den Versuchsansätzen der Varianten 3 – 5 und 17 – 19 auch (Epi)-iso-Chlortetracyclin im Boden nachweisbar. Die Bildung dieses Transformationsproduktes konnte im Zuge der Güllefermentation beobachtet werden (vgl. **Kapitel 4.3.1.2**). Die Gehalte im Boden waren mit $10,4 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ bis $32,5 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ im Sandboden und $7,0 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ bis $18,8 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ im Lößboden sehr gering.

4.3.1.4 Bilanzierung des Weidelgrasaufwuchses

Aus den erhobenen Analysenergebnissen der Einzeluntersuchungen (Weidelgras, Rindergülle und Boden) kann eine Bilanzierung vorgenommen werden. Über diese soll der prozentuale Übergang (die Transferrate) der Antibiotika aus dem Boden in die Pflanzen bestimmt werden. Durch die Korrelation der Analysenergebnisse können verschiedene Aussagen aus dem Aufwuchsversuch gezogen werden (**Abbildung 4-24**).

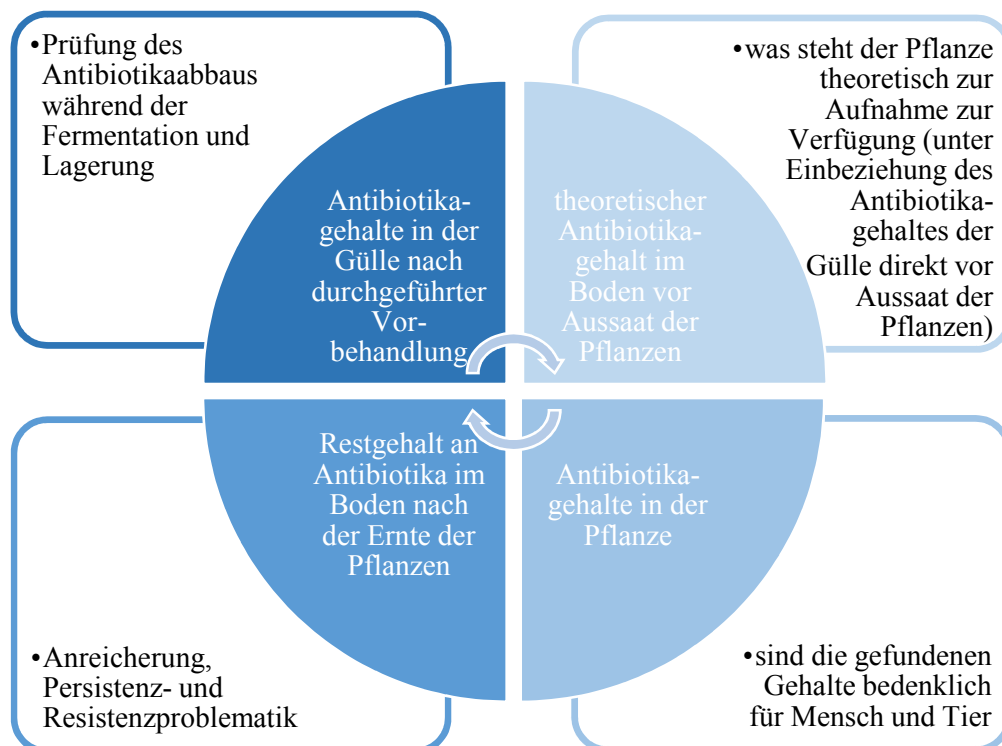


Abbildung 4-24: Untersuchungsumfang eines Aufwuchsprojektes und daraus gewonnene Erkenntnisse zur Beurteilung des Verhaltens von Antibiotika in der Umwelt.

Die Fermentation und Lagerung von Gülle kann zu einem vollständigen oder teilweisen Abbau bzw. Umbau der darin enthaltenen Antibiotika führen (vgl. **Kapitel 5.2.1** und darin genannte Literatur). In der vorliegenden Arbeit konnte dies bestätigt werden. Bei der Berechnung des Überganges der Antibiotika aus güllegedüngtem Boden in die Pflanze darf folglich nicht von dem ursprünglich dotierten Antibiotikagehalt ausgegangen werden. Der tatsächlich analysierte

Gehalt nach der Fermentation bzw. vor der Einarbeitung in den Boden ist zu bestimmen (**Kapitel 4.3.1.2**).

Durch die Kenntnis des tatsächlichen Antibiotikagehaltes in der Gülle nach der Fermentation, kann der theoretische Antibiotikagehalt im Boden c_B^t vor Aussaat der Pflanzen bestimmt werden (**Gl. 4-1**). Anmerkung: 0,5 kg Gülle wurden in 7 kg Boden eingearbeitet.

$$c_B^t [\text{mg kg}^{-1}] = \frac{G_G}{G_{GB}} \quad (\text{Gl. 4-1})$$

mit:

G_G Absoluter Antibiotikagehalt in der Gülle nach der Fermentation [mg]
(auf 0,5 kg bezogen)

G_{GB} Gülle-Boden-Mischung [kg] (im vorliegenden Fall 7,5 kg)

Dieser Gehalt steht der Pflanze theoretisch zur Aufnahme zur Verfügung und dient somit als Bezugsgröße für die Berechnung des prozentualen Überganges $TR_{Pfl.}$ [%] in die Pflanze (**Gl. 4-2**).

$$TR_{Pfl.} [\%] = \frac{c_{Pfl.} \cdot 100}{c_B^t \cdot 1000} \quad (\text{Gl. 4-2})$$

mit:

$c_{Pfl.}$ Antibiotikagehalt in der Pflanze [$\mu\text{g kg}_{TM}^{-1}$]

c_B^t Theoretischer Antibiotikagehalt im Boden nach Einarbeitung der Gülle [mg kg^{-1}]

100 Umrechnungsfaktor in %

1000 Umrechnung von mg kg^{-1} in $\mu\text{g kg}^{-1}$

Über Gleichung **Gl. 4-2** kann neben dem prozentualen Übergang in die Pflanze auch der prozentuale Verbleib im Boden ermittelt werden. Hierzu muss der Antibiotikagehalt im Boden nach der Ernte bestimmt (**Kapitel 4.3.1.3**) und auf den theoretischen Antibiotikagehalt im Boden bezogen werden. Über diese Daten können später Aussagen in Bezug auf die Persistenz diskutiert werden. Die Ergebnisse der Bilanzierung des Weidelgrasaufwuchses sind in **Abbildung 4-25** und **Tabelle 4-14** wiedergegeben. Tetracycline konnten in den oberirdischen Pflanzenteilen nicht nachgewiesen werden, während Sulfonamide auch in die Pflanze übergehen können. Die Schwankungen des (Epi)-Chlortetracyclins im Boden, könnten aus einer inhomogenen Verteilung des Wirkstoffes im Boden resultieren. In der Gülle und im Boden war kein *N*-Acetyl-Sulfamethazin nachweisbar, was für eine Bildung des Metaboliten in der Pflanze sprechen könnte (vgl. **Kapitel 5.4**).

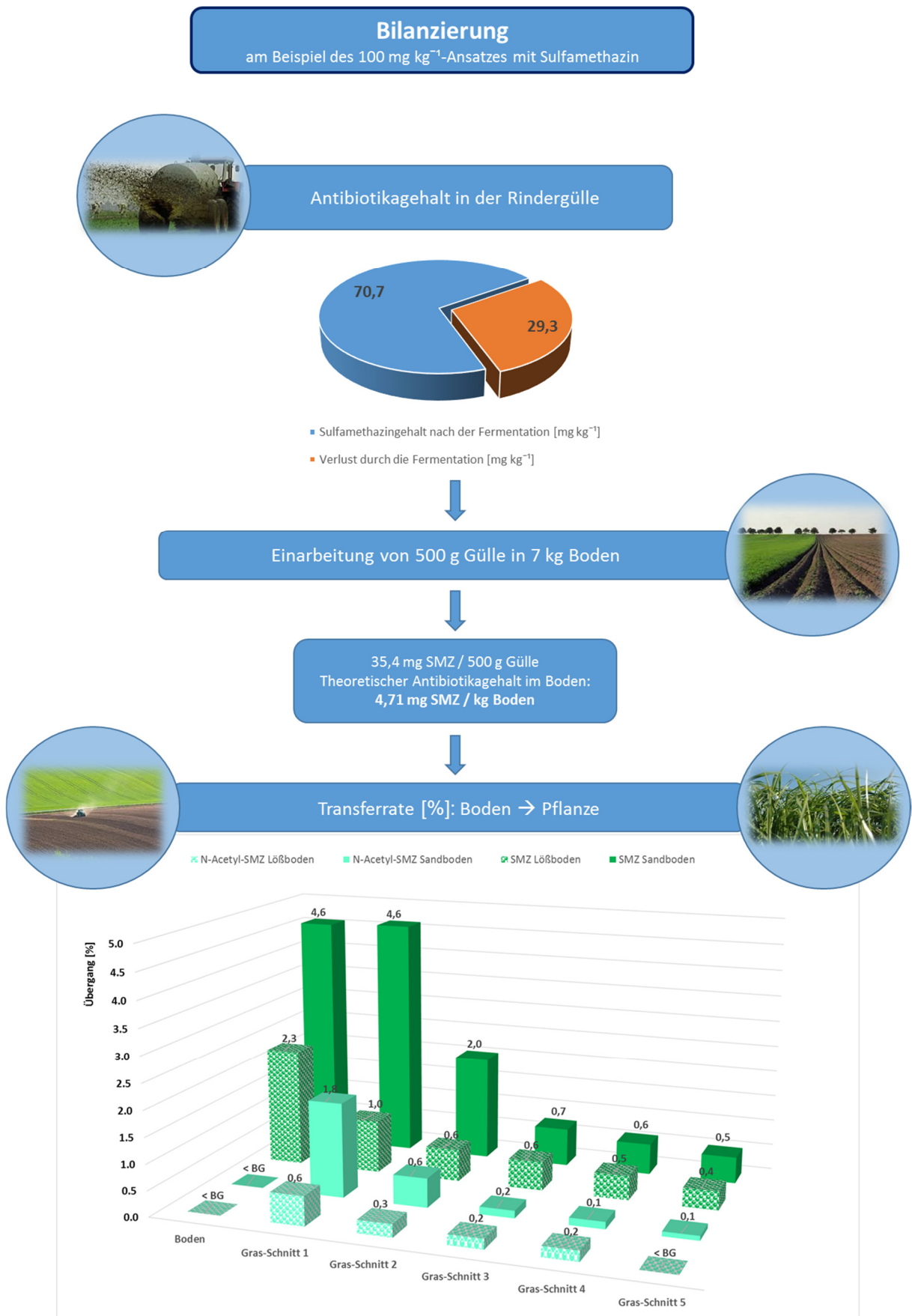


Abbildung 4-25: Bilanzierungsschema für Deutsches Weidelgras am Beispiel des 100 mg kg⁻¹-Versuchsansatzes mit Sulfamethazinzugabe über das Düngemittel.

Tabelle 4-14: Verbleib der über Gülle eingetragenen Antibiotika im Boden nach Ernte der Pflanzen und deren Transferraten in die Weidelgras-Schnitte.

Variante	Boden	Analyt	Theoretische Antibiotikakonzentration im Boden nach Einarbeitung der Gülle [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Verbleib im Boden [%] ^a	Antibiotika-Transferraten vom Boden in das Weidelgras [%]				
					1.Schnitt	2.Schnitt	3.Schnitt	4.Schnitt	5.Schnitt
3	Volkmarser Sandboden	(Epi)-CTC / (Epi)-iso-CTC	293,3 / 1100,0	13,2 / (0,9)	-	-	-	-	-
4		(Epi)-CTC / (Epi)-iso-CTC	820,0 / 2446,7	10,6 / (0,4)	-	-	-	-	-
5		(Epi)-CTC / (Epi)-iso-CTC	2553,3 / 4113,3	5,1 / (0,8)	-	-	-	-	-
6		(Epi)-DOX	1100,0	9,6	-	-	-	-	-
7		(Epi)-DOX	2693,3	11,7	-	-	-	-	-
8		(Epi)-DOX	5113,3	10,5	-	-	-	-	-
12		SMZ / N-Ac-SMZ	973,3 / -	3,7	1,6 / -	1,1 / -	0,7 / -	0,6 / -	0,5 / -
13		SMZ / N-Ac-SMZ	2473,3 / -	4,1	2,0 / 1,1	0,7 / 0,2	0,5 / -	0,4 / -	0,3 / -
14	SMZ / N-Ac-SMZ	4713,3 / -	4,6	4,6 / 1,8	2,0 / 0,6	0,7 / 0,2	0,6 / 0,1	0,5 / 0,1	
17	Baunataler Lössboden	(Epi)-CTC / (Epi)-iso-CTC	293,3 / 1100,0	5,1 / (0,6)	-	-	-	-	-
18		(Epi)-CTC / (Epi)-iso-CTC	820,0 / 2446,7	5,2 / (0,5)	-	-	-	-	-
19		(Epi)-CTC / (Epi)-iso-CTC	2553,3 / 4113,3	3,5 / (0,5)	-	-	-	-	-
20		(Epi)-DOX	1100,0	6,6	-	-	-	-	-
21		(Epi)-DOX	2693,3	5,4	-	-	-	-	-
22		(Epi)-DOX	5113,3	6,0	-	-	-	-	-
26		SMZ / N-Ac-SMZ	973,3 / -	1,6	-	-	-	-	-
27		SMZ / N-Ac-SMZ	2473,3 / -	2,1	0,7 / 0,3	0,5 / -	0,5 / -	0,7 / -	0,4 / -
28	SMZ / N-Ac-SMZ	4713,3 / -	2,3	1,0 / 0,6	0,6 / 0,3	0,6 / 0,2	0,5 / 0,2	0,4 / -	

^a Für die Berechnung wurde der mit der neu entwickelten Methode extrahierbare Anteil im Boden zugrunde gelegt.

4.3.2 Untersuchung des Möhrenaufwuchses

Bei dem Weidelgrasaufwuchs konzentrierten sich die Untersuchungen auf das Antibiotikaaufnahmeverhalten in Pflanzen bei praxisüblicher Antibiotikabelastung des Versuchsbodens. Das Untersuchungsziel des Möhrenaufwuchses bestand hingegen darin, den Antibiotikaverbleib in den unterschiedlichen Pflanzenkompartimenten zu untersuchen und die Unterschiede im Antibiotikaaufnahmeverhalten unter der Verwendung gelagerter und fermentierter Rindergülle herauszustellen.

4.3.2.1 Untersuchung der Möhren

Eine detaillierte Beschreibung der Versuchsdurchführung mit einer tabellarischen Auflistung der Versuchsansätze ist in **Kapitel 3.6.3** wiedergegeben. Die Probenaufarbeitung ist **Kapitel 3.10.4.1** zu entnehmen.

Begonnen wurde mit der Untersuchung des **Möhrengrüns**. Auch im Möhrengrün konnten lediglich Sulfonamide nachgewiesen werden. Dies ist eine Parallele zu dem Weidelgrasaufwuchs. Sulfamethazin war sowohl in Varianten welche mit gelagerter Gülle gedüngt wurden, als auch in Varianten mit fermentierter Gülleanwendung quantifizierbar. Die Ansätze mit fermentierter Gülle wiesen höhere Rückstandskonzentrationen an Sulfamethazin auf, welche im Mittel $38,9 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ betragen. In Versuchsansätzen mit gelagerter Gülle belief sich die gefundene gemittelte Konzentration auf $23,9 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$. Sulfamethoxazol konnte hingegen nur in Ansätzen mit gelagerter Gülle oberhalb der Bestimmungsgrenze quantitativ bestimmt werden. Die gefundene Konzentration lag mit $4,1 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ deutlich unter der nachgewiesenen Sulfamethazinkonzentration. Hierfür könnte das unterschiedliche Abbauverhalten der beiden Substanzen im Zuge der Güllevorbehandlung verantwortlich sein (vgl. **Kapitel 4.3.2.2**). Bereits beim Weidelgrasaufwuchs konnte gezeigt werden, dass Sulfamethoxazol nach 35-tägiger Fermentation nicht mehr in der Gülle nachweisbar ist. Neben den vier dotierten Antibiotika wurde auch bei den Möhren auf das Vorhandensein möglicher Metabolite und Transformationsprodukte untersucht. Hierzu zählten *N*-Acetyl-Sulfamethazin, *N*-Acetyl-Sulfamethoxazol und (Epi)-iso-Chlortetracyclin. Neben Sulfamethazin konnte auch der Metabolit *N*-Acetyl-Sulfamethazin in den Möhrengrünproben nachgewiesen werden. **Abbildung 4-26** gibt einen Überblick über die gemittelten Antibiotika-Rückstandskonzentrationen im Möhrengrün.

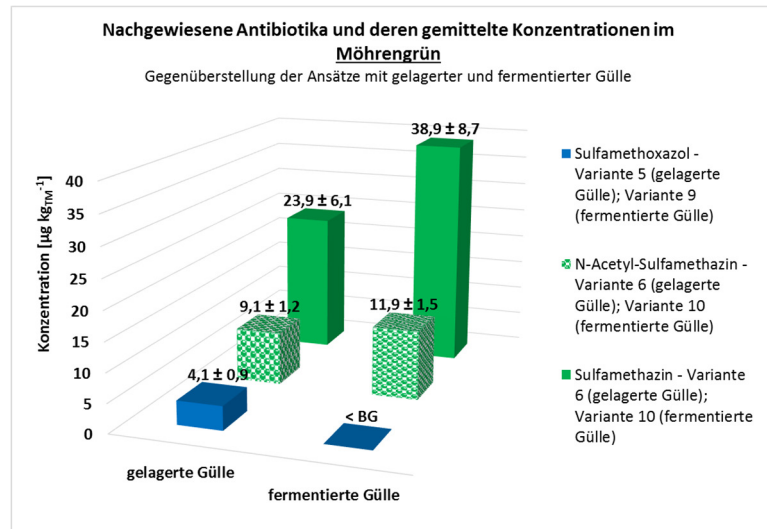


Abbildung 4-26: Darstellung der gefundenen Antibiotikakonzentration in dem Möhrengrün der Ansätze mit gelagerter und fermentierter Rindergülle \pm der Standardabweichung ($n = 6$).

In der **Möhrenrübe** konnte neben den beiden Sulfonamiden (Sulfamethazin und Sulfamethoxazol) auch (Epi)-Doxycyclin aus der Wirkstoffgruppe der Tetracycline nachgewiesen werden. In Ansätzen mit fermentierter Gülle war der Gehalt an (Epi)-Doxycyclin mit $9,8 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ höher als in Ansätzen mit gelagerter Gülle. Hier betrug die Konzentration lediglich $2,6 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$. Sulfamethazin konnte sowohl in Variante 6, als auch in Variante 10 mit je ca. $10 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ bestimmt werden. Sulfamethoxazol war auch in der Möhrenrübe nur in Ansätzen mit gelagerter Gülle nachweisbar. Die Konzentration betrug im Mittel $19,3 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$. Im Vergleich zu den Antibiotikarückständen im Möhrengrün, waren die Gehalte an Sulfamethazin in der Rübe deutlich geringer. Sulfamethoxazol wies hingegen in der Möhrenrübe einen höheren Gehalt auf. Acetylierte Metabolite der Sulfonamide oder die Isoform des (Epi)-Chlortetracyclins waren in der Möhrenrübe nicht nachweisbar. **Abbildung 4-27** stellt die nachgewiesenen Antibiotika und deren gemittelte Konzentrationen in der Möhrenrübe dar.

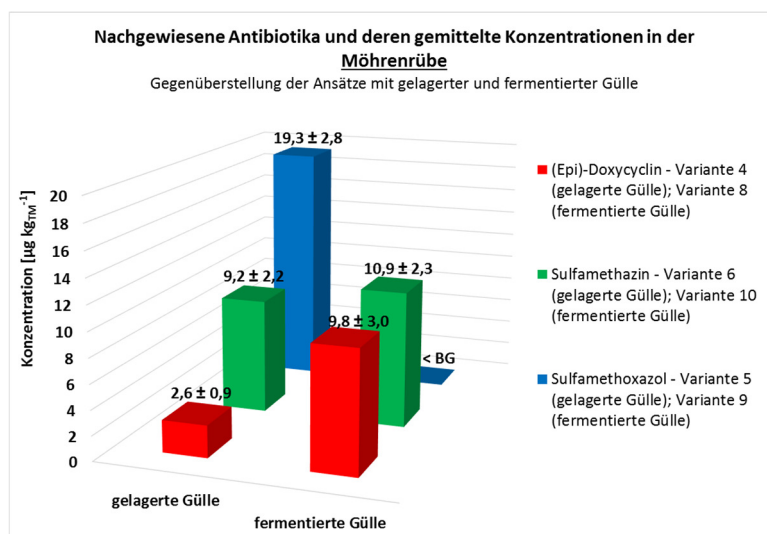


Abbildung 4-27: Darstellung der gefundenen Antibiotikakonzentration in den Möhrenrüben der Ansätze mit gelagerter und fermentierter Rindergülle \pm der Standardabweichung ($n = 6$).

Die **Möhrenschalen** enthielten alle vier Antibiotika. (Epi)-Chlortetracyclin, (Epi)-Doxycyclin und Sulfamethazin konnten sowohl in Ansätzen mit fermentierter, als auch in Ansätzen mit gelagerter Gülle nachgewiesen werden. Sulfamethoxazol war mit einem Gehalt von $15,7 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ lediglich in Ansätzen mit gelagerter Gülle quantifizierbar. Sowohl Möhren die mit gelagerter Gülle behandelt wurden, als auch Möhren, welche einer Düngung mit fermentierter Gülle unterzogen wurden, wiesen eine Sulfamethazinkonzentration in der Schale von ca. $30 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ auf. Besonders auffällig war der hohe Gehalt an (Epi)-Doxycyclin in Ansätzen mit fermentierter Gülle. Für diesen Wirkstoff wurden $182,0 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ nachgewiesen. In Ansätzen mit gelagerter Gülle konnten im Mittel $37,0 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ (Epi)-Doxycyclin nachgewiesen werden. Der analysierte Gehalt an (Epi)-Chlortetracyclin war hingegen deutlich geringer. Er betrug in Ansätzen mit gelagerter Gülle im Mittel $5,8 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$, während in Ansätzen mit fermentierter Gülle noch etwas weniger nachgewiesen werden konnte. In Analogie zu der Möhrenrübe sind auch in der Schale keine acetylierten Metaboliten der Sulfonamide nachweisbar. Auch (Epi)-iso-Chlortetracyclin ist trotz des Eintrags über Gülle (vgl. **Kapitel 4.3.2.2**) nicht in Variante 7 bestimmbar. **Abbildung 4-28** fasst die in der Möhrenschaale gefundenen Antibiotika zusammen.

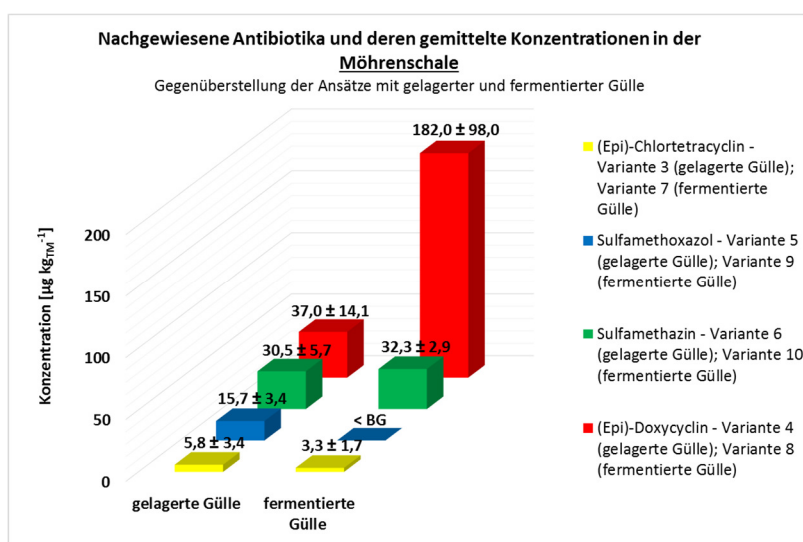


Abbildung 4-28: Darstellung der gefundenen Antibiotikakonzentration in den Möhrenschaalen der Ansätze mit gelagerter und fermentierter Rindergülle \pm der Standardabweichung ($n = 6$).

Da die **Möhrenwurzeln** mengenmäßig den geringsten Anteil an der Möhre ausmachen, stand für die Analyse nur wenig Probenmaterial zur Verfügung. Aufgrund dessen wurden die Möhrenwurzeln dreier Wiederholungen (a, c, d) vereinigt und vierfach aufgearbeitet. Für die Bestimmung der Trockenmasse wurde eine Mischprobe aus verschiedenen Varianten gebildet, die Trockenmasse dreifach daraus ermittelt und der arithmetische Mittelwert für die Umrechnung aller Varianten herangezogen. Im Vergleich zu allen anderen untersuchten Möhrenkompartimenten konnten in den Möhrenwurzeln die höchsten Antibiotikarückstände bestimmt werden. Auch hier waren die Gehalte an (Epi)-Chlortetracyclin, (Epi)-Doxycyclin und Sulfamethazin in Varianten, welche mit fermentierter Gülle gedüngt wurden am höchsten. Die quantifizierten mittleren Konzentrationen betragen für (Epi)-Doxycyclin $772,3 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$, für Sulfamethazin

543,9 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ und für (Epi)-Chlortetracyclin 278,5 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$. Sulfamethoxazol war aufgrund der Eliminierung während der Fermentation nicht mehr in Ansätzen mit fermentierter Gülle nachweisbar. In Ansätzen mit gelagerter Gülle konnten 181,0 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ Sulfamethoxazol in den Wurzeln bestimmt werden. Alle in den Möhrenwurzeln nachgewiesenen Antibiotika und deren gemittelte Gehalte sind in **Abbildung 4-29** dargestellt. Neben den ursprünglich dotierten Antibiotika waren auch der Metabolit *N*-Acetyl-Sulfamethazin und das Transformationsprodukt (Epi)-iso-Chlortetracyclin in den Wurzeln nachweisbar. Die Gehalte an *N*-Acetyl-Sulfamethazin lagen deutlich unter denen der Ursprungssubstanz des gleichen Ansatzes. Der Gehalt an (Epi)-iso-Chlortetracyclin betrug im Ansatz mit fermentierter Gülle 150,0 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$. Bei dem Ansatz mit gelagerter Gülle lag die Konzentration an (Epi)-iso-Chlortetracyclin bei 19,1 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ (**Abbildung 4-30**). In **Tabelle B-6** und **Tabelle B-7** sind die nachgewiesenen Antibiotikagehalte aufgeführt.

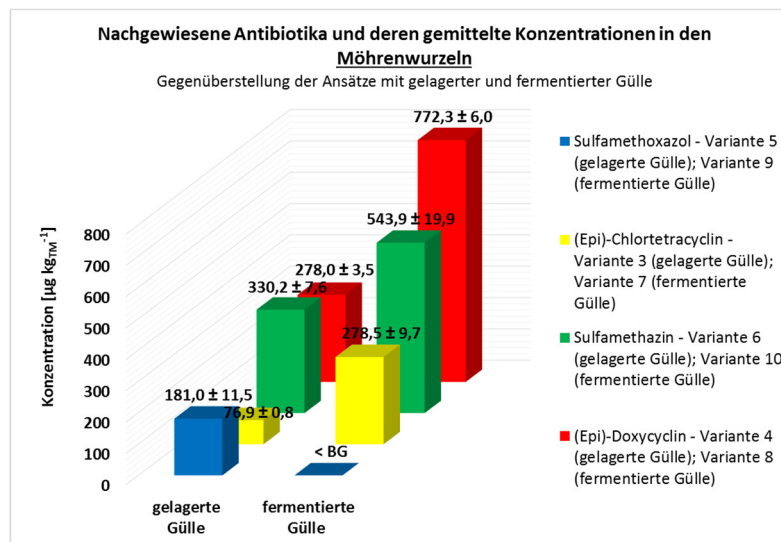


Abbildung 4-29: Darstellung der gefundenen Antibiotikakonzentration in den Möhrenwurzeln der Ansätze mit gelagerter und fermentierter Rindergülle \pm der Standardabweichung ($n = 4$).

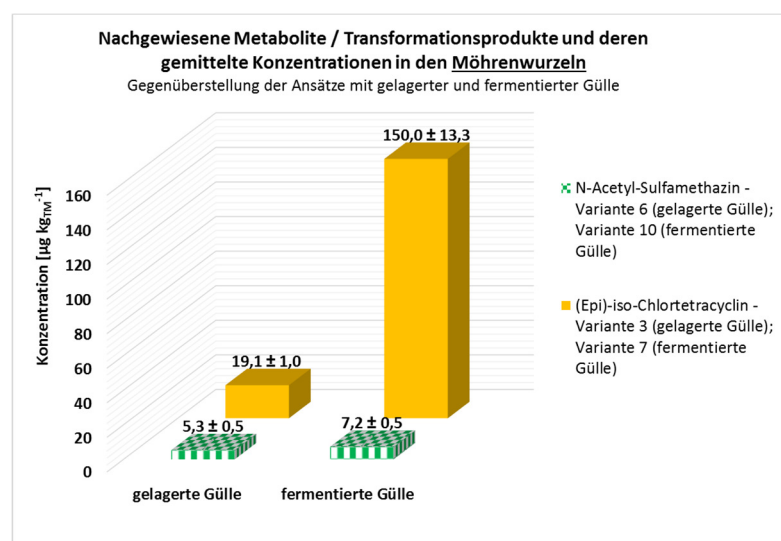


Abbildung 4-30: Darstellung der Konzentration der gefundenen Metabolite und Transformationsprodukte in den Möhrenwurzeln der Ansätze mit gelagerter und fermentierter Rindergülle \pm der Standardabweichung ($n = 4$).

4.3.2.2 Untersuchung der Rindergülle im Verlauf der Fermentation und Lagerung

Gemäß den Erkenntnissen aus Literaturdaten kann es während der Güllefermentation zu einer Konzentrationsabnahme der darin enthaltenen Antibiotika kommen (vgl. hierzu **Kapitel 1.5.3** und dort aufgeführte Literatur). Die Gülleuntersuchungen aus dem Aufwuchsjahr 2014 bestätigten dieses Verhalten für alle vier Zielanalyten (Chlortetracyclin, Doxycyclin, Sulfamethazin und Sulfamethoxazol). Mögliche Ursachen für die Konzentrationsabnahme können Abbau, Transformations- und Sorptionsprozesse an feststoffreiche Matrixbestandteile (nicht-extrahierbare Rückstände) im Laufe der Fermentation sein. Eine ausführliche Diskussion erfolgt in **Kapitel 5.2**. In dem Fermentationsansatz mit Chlortetracyclinzugabe konnte im Jahr 2014 bereits das Transformationsprodukt (Epi)-iso-Chlortetracyclin identifiziert und quantifiziert werden.

Bei dem Aufwuchsprojekt 2015 wurde eine Gülleprobenahme über den kompletten Fermentationsverlauf und Lagerzeitraum vorgenommen. Anhand dieser Daten konnte die Konzentrationsabnahme der vier zugesetzten Antibiotika Chlortetracyclin, Doxycyclin, Sulfamethazin und Sulfamethoxazol über einen zeitlichen Verlauf graphisch aufgezeigt werden. Auch die zeitliche Bildung bekannter Metabolite und Transformationsprodukte (*N*-Acetyl-Sulfamethazin, *N*-Acetyl-Sulfamethoxazol, (Epi)-iso-Chlortetracyclin) konnte verfolgt werden.

Abbildung 4-31 zeigt das Eliminierungsverhalten der einzelnen Wirkstoffe in Gülleproben im Verlauf des 40-tägigen *Fermentationsprozesses*. Die ermittelten Gehalte mit Angabe der Standardabweichung und dem prozentualen Verlust sind in **Tabelle B-8** und **Tabelle B-9** zusammengefasst. Gemäß den Datenerhebungen wiesen alle zugesetzten Antibiotika eine Konzentrationsabnahme über den betrachteten Fermentationszeitraum auf. Diese Abnahme war wirkstoffspezifisch. Zudem konnten Unterschiede innerhalb einer Wirkstoffgruppe beobachtet werden. Die graphische Auftragung zeigte für (Epi)-Chlortetracyclin eine kontinuierliche Abnahme der Konzentration im Verlauf der 40-tägigen Fermentation. Die Kurve fiel bis zu dem 15. Fermentationstag stark ab und zeigte dann einen flacheren Verlauf. Mit der Abnahme an (Epi)-Chlortetracyclin kam es im Zuge der Fermentation zur Bildung des Transformationsproduktes (Epi)-iso-Chlortetracyclin. Die Bildung des Transformationsproduktes nahm bis zu dem 18. Fermentationstag zu und stagnierte im Anschluss daran um einen Wert von $57 \text{ mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$. Die Konzentration an (Epi)-Doxycyclin unterlag über den betrachteten Fermentationsprozess starken Schwankungen. In der ersten Fermentationshälfte nahm der Doxycyclingehalt bis zu dem 15. Fermentationstag auf ca. $45 \text{ mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$ ab. Danach konnte ein erneuter Anstieg bis zu einem Maximum an Tag 27 mit einem (Epi)-Doxycyclingehalt von ca. $75 \text{ mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$ verzeichnet werden. Über die zweite Fermentationshälfte war nochmals ein Konzentrationsabfall zu beobachten. Die Konzentration an Sulfamethazin nahm innerhalb der ersten 8 Fermentationstage stark ab. Die Kurve verlief danach flacher um einen Wert von $43 \text{ mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$. Sulfamethoxazol zeigte die höchste Konzentrationsabnahme im Laufe der Fermentation. Lediglich in Proben, welche am Tag Null und am ersten Fermentationstag gezogen wurden, konnte Sulfamethoxazol quantitativ nachgewiesen werden.

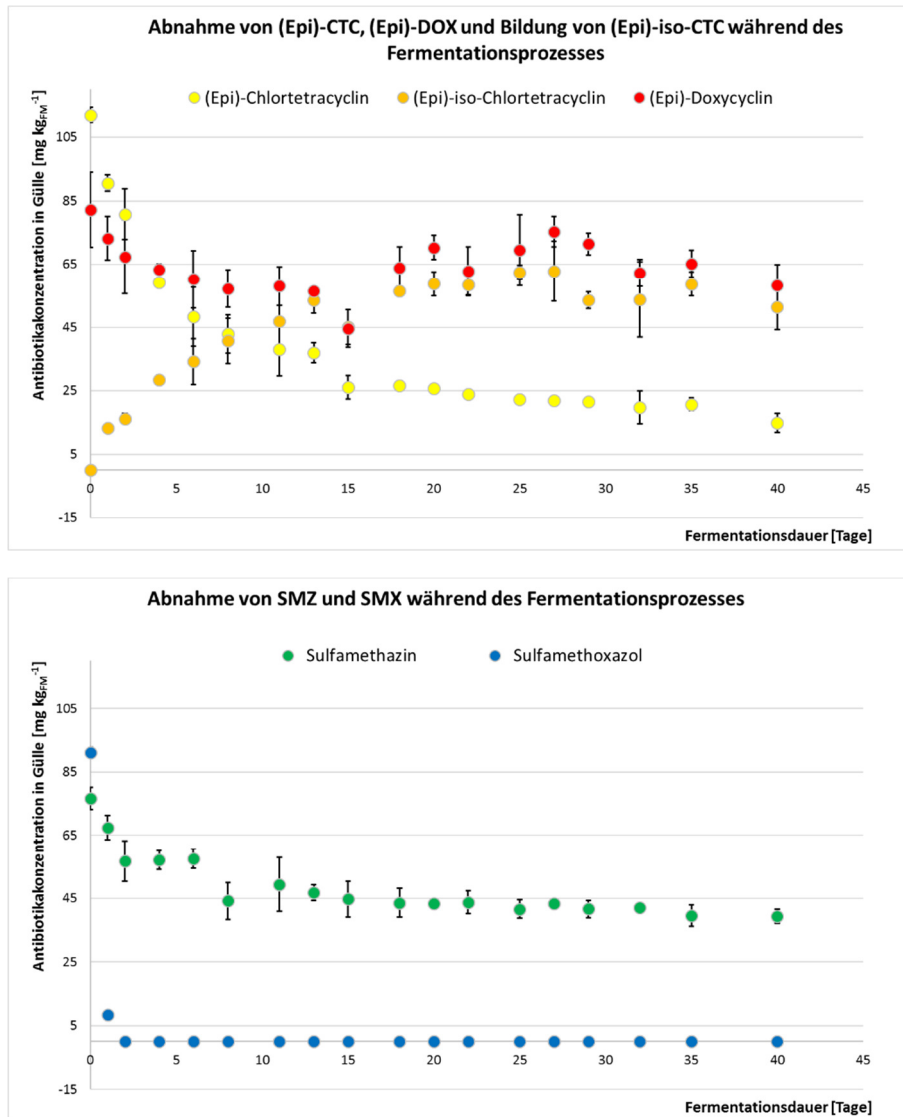


Abbildung 4-31: Eliminierungsverhalten der einzelnen Wirkstoffe in Gülle im Laufe des Fermentationsprozesses über einen Zeitraum von 40 Tagen ($n = 3$).

Abbildung 4-32 zeigt das Eliminierungsverhalten der einzelnen Wirkstoffe in Gülleproben während der 8-tägigen Lagerung bei 20 °C unter aeroben Bedingungen. Auch bei der **Güllelagerung** nahmen die Gehalte aller Antibiotika ab. Die Abnahme war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei dem Fermentationsprozess. Die beiden Tetracycline wurden im Vergleich zu dem Fermenteransatz deutlich langsamer eliminiert. Nach 8 Tagen waren von den zugesetzten 100 $\text{mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$ noch $\geq 85 \text{ mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$ in der Gülle nachweisbar. Auch die Bildung von (Epi)-iso-Chlortetracyclin erfolgte langsamer. Erst in Proben des achten Lagertages war das Transformationsprodukt quantitativ mit einem mittleren Gehalt von 2,6 $\text{mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$ bestimmbar. Auch im Zuge der Güllelageung fand eine rasche Eliminierung des Sulfamethoxazols statt. Da die Lagerung unter anderen Bedingungen erfolgte als die Fermentation, konnten am Ende der Lagerung noch Rückstände an Sulfamethoxazol quantifiziert werden. Am achten Tag betrug die Sulfamethoxazolkonzentration im Mittel 7,7 $\text{mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$. Sulfamethazin unterlag einer Abnahme von ca. 16 %. Die ermittelten Gehalte mit Angabe der Standardabweichung und dem prozentualen Verlust sind in **Tabelle B-10** zusammengefasst. Die Sulfamethazinkonzentration

wies größere Schwankungen über die gesamte Lagerungsdauer auf, mit der Tendenz einer Eliminierung. Auch die Probenahme kann ausschlaggebend für Konzentrationsschwankungen sein. Durch die Inhomogenität der Gülle kann nicht vermieden werden, dass veränderliche Anteile an Fest- und Flüssigbestandteilen aus den Reaktoren entnommen werden. Eine repräsentative Probenahme wird bei dieser Matrix erschwert (vgl. **Kapitel 5.2.1**).

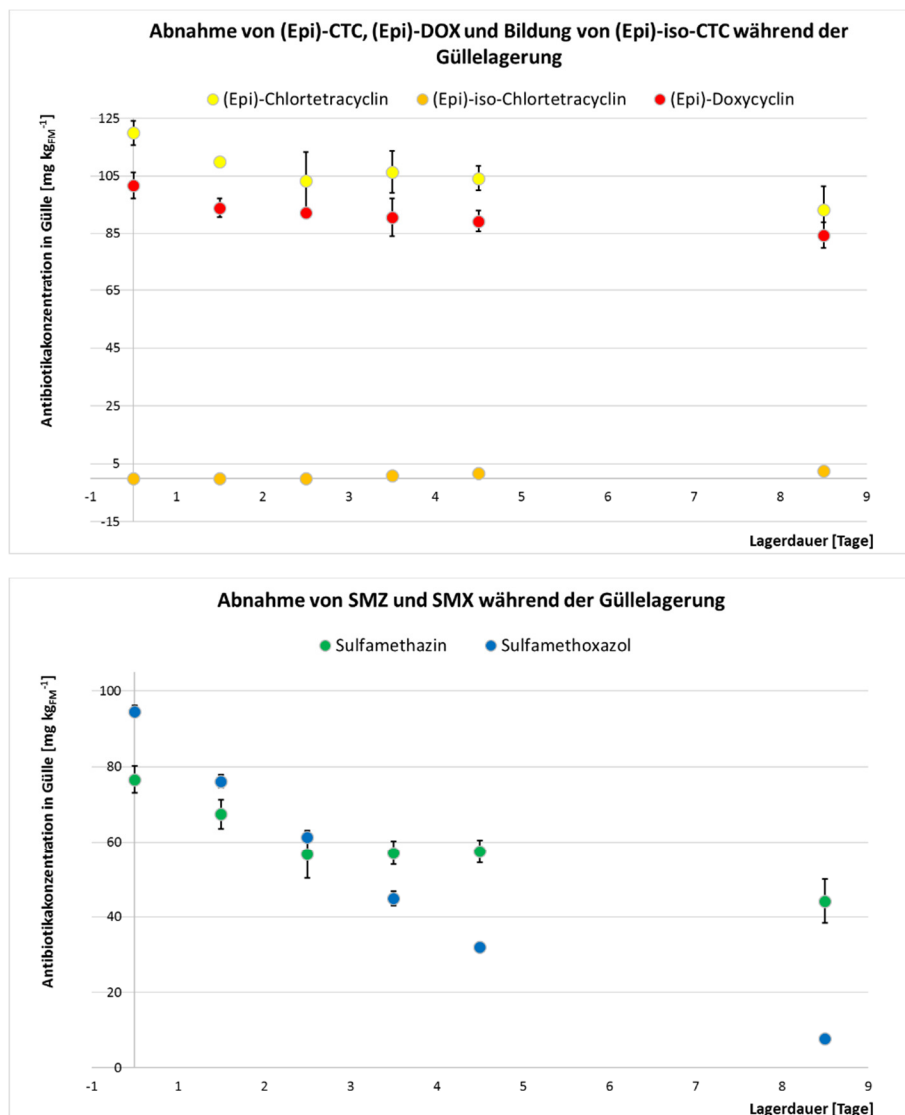


Abbildung 4-32: Eliminierungsverhalten der einzelnen Wirkstoffe in Gülle im Laufe der Güllelagerung über einen Zeitraum von 8 Tagen ($n = 3$).

Direkt nach der Lagerung bzw. Fermentation der Rindergülle, erfolgte deren Einarbeitung in den Versuchsboden. Das Eliminierungsverhalten zeigte, dass die Bestimmung des Antibiotikagehaltes nach der entsprechenden Güllevorbehandlung notwendig ist, um anhand dieser Messgröße den theoretisch in den Boden eingetragenen Antibiotikagehalt abschätzen zu können.

4.3.2.3 Einfluss der Güllevorbehandlung auf die Zusammensetzung der Gülle

Um Unterschiede in der Güllezusammensetzung aufgrund der unterschiedlichen Vorbehandlungsvarianten darzulegen, wurde am LHL Standort Eichhof in Bad Hersfeld eine Nährstoffanalyse der Gülle durchgeführt. Die größten Unterschiede in der Zusammensetzung von gelagerter und fermentierter Gülle ergaben sich in dem Gehalt der Trockenmasse, dem Anteil an Ammoniumstickstoff und dem pH-Wert (**Tabelle 4-15**). So wies die gelagerte Gülle einen Trockenmassegehalt von 9,5 % auf, während fermentierte Gülle 7,1 % Trockenmasse enthielt. Der Verlust an Feststoffen in der fermentierten Gülle ergibt sich durch einen Abbau von Schleimstoffen und natürlicher Trockensubstanz im Zuge des Fermentationsprozesses, was zu einer Reduzierung der Viskosität und damit verbunden zu einem besseren Eintrag der Nährstoffe aus der Gülle in den Boden führt (mündliche Aussage der Mitarbeiter des LHL-Standortes Eichhof). Der Anteil an pflanzenverfügbarem Ammoniumstickstoff war in der fermentierten Rindergülle etwas höher (0,18 % – 0,21 %) als in der gelagerten Rindergülle (0,15 %). Dies resultiert aus der Umwandlung von Ammonium zu gasförmigem Ammoniak (bis 40 % des Gesamtstickstoffs) in belüfteter Gülle wodurch auch tendenziell ein höherer pH-Wert von 8 bis 9 zu erwarten ist (Galler, 2009).

Tabelle 4-15: Ergebnisse der Nährstoffanalyse des LHL Eichhofs für die Rindergülle.

Parameter	Ergebnisse in Rindergülle			Einheiten	Prüfmethoden
	fermentiert 2014	fermentiert 2015	gelagert 2015		
Trockenmasse	7,05	7,10	9,48	%	DIN EN 12880 (EH)
org. Trockenmasse	5,37	5,43	7,41	%	DIN EN 12880 (EH)
pH-Wert	7,8	7,9	8,2		
Ammonium-N	0,21	0,18	0,15	%	
Gesamtstickstoff (N)	0,35	0,32	0,35	%	DIN EN 13342
Phosphor (P ₂ O ₅)	1,05	1,00	1,84	kg/t OS	DIN EN ISO 11885
Kalium (K ₂ O)	6,62	3,78	4,25	kg/t OS	DIN EN ISO 11885
Schwefel (S)	0,55	0,32	0,43	kg/t OS	DIN EN ISO 11885
Calcium (CaO)	n. b.	2,75	3,20	kg/t OS	DIN EN ISO 11885
Magnesium (MgO)	n. b.	0,71	1,10	kg/t OS	DIN EN ISO 11885
Natrium (Na)	n. b.	0,52	0,40	%	DIN EN ISO 11885

OS: Originalsubstanz; n. b.: nicht bestimmt

4.3.2.4 Untersuchung der Bodenproben nach der Ernte der Möhren

Die Versuchsböden der einzelnen Varianten wurden nach der Ernte der Möhren auf Antibiotikarückstände untersucht. Die Aufarbeitung der Bodenproben erfolgte gemäß der in **Kapitel 3.10.4.2** angegebenen Versuchsvorschrift. Die Probenahme erfolgte in Analogie zu dem Weidelgrasprojekt (vgl. **Kapitel 4.3.1.3**). Bodenproben dreier Wiederholungen (drei Mitscherlichgefäße) wurden von jeder Variante zur Analyse herangezogen und je in Doppelbestimmung

aufgearbeitet und gemessen. Aus den daraus erhaltenen sechs Messwerten wurde der arithmetische Mittelwert gebildet. Die Gehalte sind auf Frisch- und Trockenmasse bezogen angegeben. Die Ergebnisse der Trockenmassebestimmung sind im Anhang aufgeführt.

Sulfamethoxazol war lediglich in Bodenproben welche mit gelagerter Gülle beaufschlagt wurden nachweisbar (**Abbildung 4-33**). Die gemittelte Rückstandskonzentration war mit $4,5 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ am geringsten. (Epi)-Doxycyclin wies mit $160,7 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ die höchste Konzentration im Boden auf. Die Konzentrationen an (Epi)-Chlortetracyclin ($77,1 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$) und Sulfamethazin ($78,4 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$) lagen nah beieinander. Generell waren die Gehalte an (Epi)-Chlortetracyclin, (Epi)-Doxycyclin und Sulfamethazin in Ansätzen mit gelagerter Gülle niedriger als in vergleichbaren Ansätzen unter Verwendung fermentierter Gülle. Dies untermauert auch das Auffinden niedrigerer Antibiotikagehalte in Möhrenpflanzen, welche mit gelagerter Gülle gedüngt wurden. Nähere Ausführungen hierzu folgen in **Kapitel 5.4.2**.

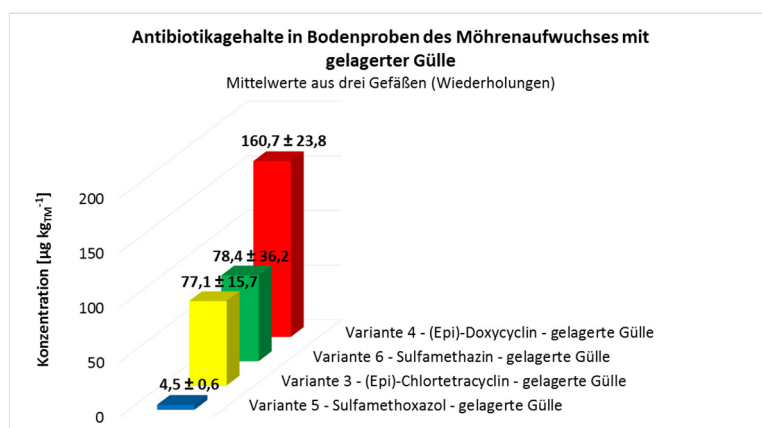


Abbildung 4-33: Antibiotikagehalte in Bodenproben des Möhrenaufwuchses nach der Ernte \pm der Standardabweichung. Dargestellt sind Böden, welche mit gelagerter Gülle beaufschlagt wurden ($n = 6$).

Ähnlich wie bei den Bodenproben des Weidelgrasaufwuchses, waren auch im Jahr 2015 in den Bodenproben mit Fermentergülle-Düngung (Epi)-Chlortetracyclin, (Epi)-Doxycyclin und Sulfamethazin nachweisbar (**Abbildung 4-34**). Sulfamethoxazol konnte nicht quantifiziert werden, da dieser Wirkstoff nach der Fermentation nicht mehr in der Gülle bestimmbar war (**Abbildung 4-31**). Die Rückstandskonzentration von (Epi)-Doxycyclin im Boden war mit $387,7 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ am höchsten, gefolgt von Sulfamethazin mit einem Rückstandsgehalt von $112,0 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ und (Epi)-Chlortetracyclin mit $96,4 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$. In den Bodenproben konnten keine Metabolite der Sulfonamide nachgewiesen werden. Das Transformationsprodukt (Epi)-iso-Chlortetracyclin war jedoch in Varianten mit (Epi)-Chlortetracyclin-Dotierung der Gülle (Variante 3 + 7) nachweisbar. **Tabelle B-11** fasst die nachgewiesenen Antibiotikagehalte im Boden nach der Ernte der Möhren unter Angabe des arithmetischen Mittelwertes und der Standardabweichung zusammen.

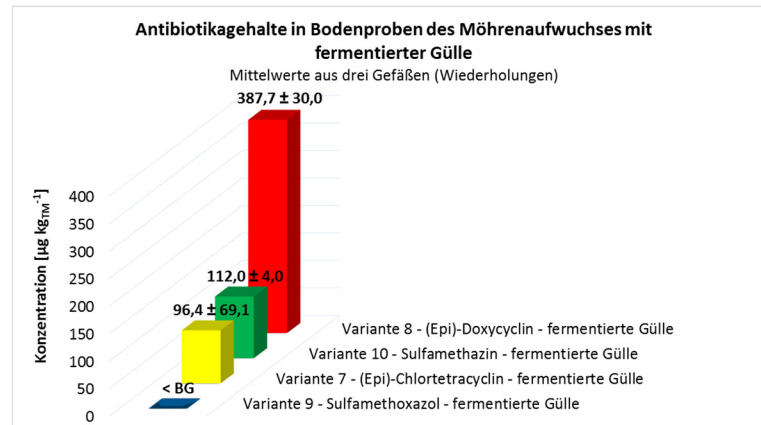


Abbildung 4-34: Antibiotikagehalte in Bodenproben des Möhrenaufwuchses nach der Ernte ± der Standardabweichung. Dargestellt sind Böden, welche mit fermentierter Gülle beaufschlagt wurden ($n = 6$).

4.3.2.5 Bilanzierung des Möhrenaufwuchses

Aus den erhobenen Analyseergebnissen der Einzeluntersuchungen (Möhrenrübe, Möhrenschnitz, Möhrengrün, Möhrenwurzeln, Rindergülle und Boden) wurde auch für den Möhrenaufwuchs eine Bilanzierung vorgenommen. Diese diente der Bestimmung des prozentualen Überganges (der Transferrate) der Antibiotika aus dem Boden in die verschiedenen Pflanzenkompartimente. Die Fermentation und Lagerung von Gülle führte zu einer Konzentrationsabnahme der darin enthaltenen Antibiotika. Bei der Berechnung des Überganges der Antibiotika aus güllegedüngtem Boden in die Pflanze darf folglich nicht von dem ursprünglich dotierten Gehalt ausgegangen werden. Der tatsächlich analysierte Gehalt nach der Fermentation bzw. Lagerung wurde vor der Einarbeitung in den Boden bestimmt (**Kapitel 4.3.2.2**). Die daraus abgeleiteten Kenngrößen c_B^t (theoretischer Antibiotikagehalt im Boden vor der Aussaat der Pflanzen) und $TR_{Pfl.}$ [%] (prozentualer Übergang in die Pflanze) wurden in Anlehnung an die Berechnungen für den Weidelgrasaufwuchs nach **Gl. 4-1** und **Gl. 4-2** vorgenommen. Anmerkung: 0,5 kg Gülle wurden in 6,5 kg Boden eingearbeitet. Neben dem prozentualen Übergang in die Pflanze wurde auch der prozentuale Verbleib im Boden über **Gl. 4-2** berechnet.

Die Ergebnisse der Bilanzierung des Möhrenaufwuchses sind für Varianten mit gelagerter Gülle in **Abbildung 4-35** und **Tabelle 4-16** dargestellt. Für Varianten mit fermentierter Gülle sind die Ergebnisse in **Abbildung 4-36** und **Tabelle 4-17** zusammengefasst. Die prozentuale Transferrate „Boden → Pflanze“ als auch der prozentuale Verbleib im Boden waren bei der Anwendung dotierter Fermentergülle für die beiden Tetracycline und Sulfamethazin deutlich höher als bei Proben der Varianten mit gelagerter Gülle. Eine Beaufschlagung des Möhrenaufwuchses mit antibiotikabelasteter fermentierter Rindergülle in der worst-case Konzentration von 100 mg kg^{-1} führte nach viermonatiger Wachstumsphase zu einem Verbleib von je ca. 9 % (Epi)-Chlortetracyclin und (Epi)-Doxycyclin, sowie 4 % Sulfamethazin im Boden. Auch geringe Mengen des während der Fermentation bzw. Lagerung der Gülle gebildeten Transformationsproduktes (Epi)-iso-Chlortetracyclin blieben im Boden zurück. Die höchsten Transferraten von dem Boden in die einzelnen Pflanzenkompartimente wurden für Möhrenwurzeln bestimmt.

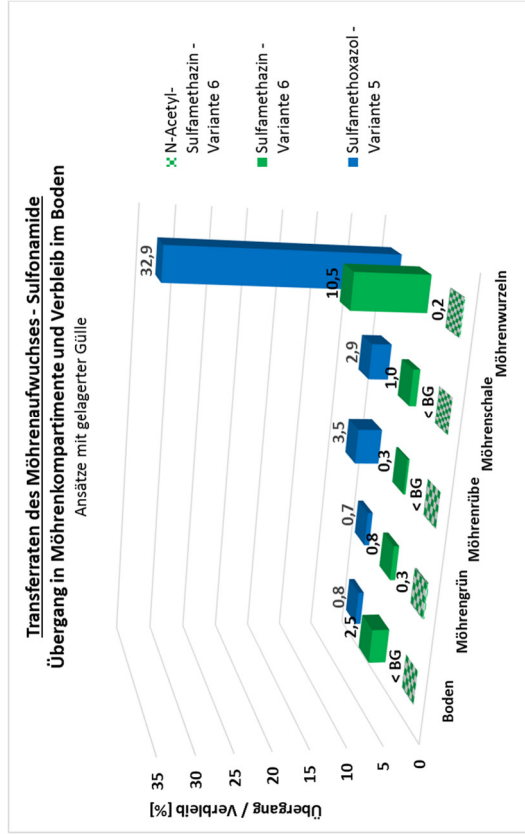
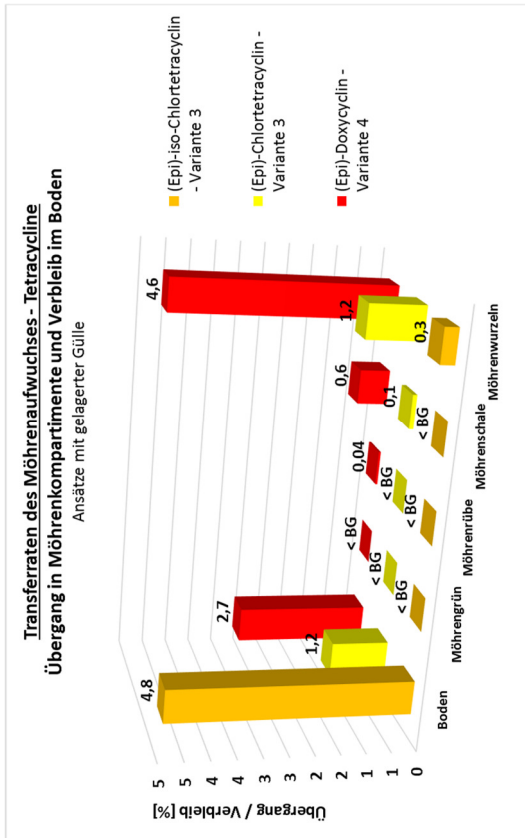


Abbildung 4-35: Bilanzierung des Möhrenaufwuchses unter Angabe der prozentualen Transferraten von dem Boden in die Pflanzenkompartimente und des prozentualen Verbleibs im Versuchsboden. Gegenüberstellung der Ansätze mit gelagerter Gülle.

Tabelle 4-16: Antibiotika-Transferraten vom Boden in die einzelnen Möhrenkompartimente und prozentualer Verbleib im Boden für Versuchsansätze mit gelagerter Rindergülle.

Variante	Analyt	Theoretische Antibiotikakonzentration im Boden nach Einarbeitung der Gülle [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Verbleib im Boden [%] ^a	Antibiotika-Transferraten vom Boden in die Möhren [%]			
				Möhrengrün	Möhrenrübe	Möhrenschale	Möhrenwurzeln
3	(Epi)-CTC / (Epi)-iso-CTC	6664,6 / 185,7	1,2 / 4,8	-	-	0,1	1,2 / 0,3
4	(Epi)-DOX	6033,8	2,7	-	0,04	0,6	4,6
5	SMX	550,3	0,8	0,7	3,5	2,9	32,9
6	SMZ / N-Acetyl-SMZ	3157,8 / -	2,5 / -	0,8 / 0,3	0,3 / -	1,0 / -	10,5 / 0,2

^a Für die Berechnung wurde der mit der neu entwickelten Methode extrahierbare Anteil im Boden zugrunde gelegt.

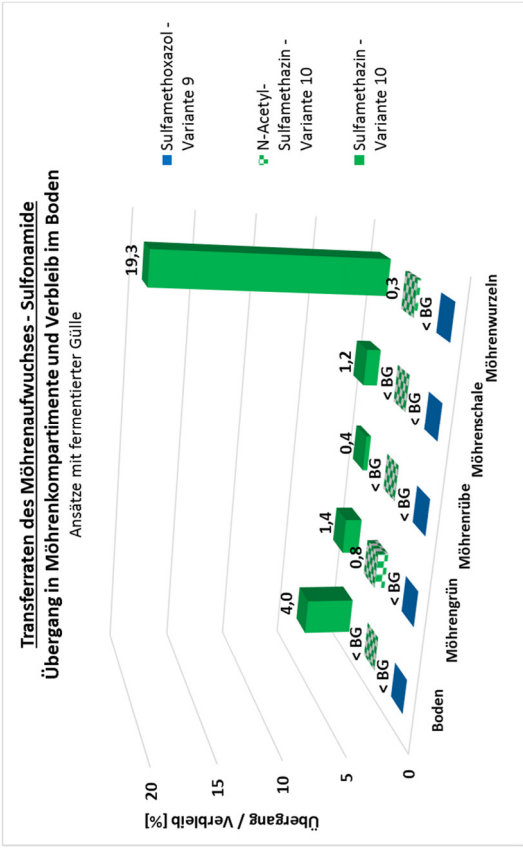
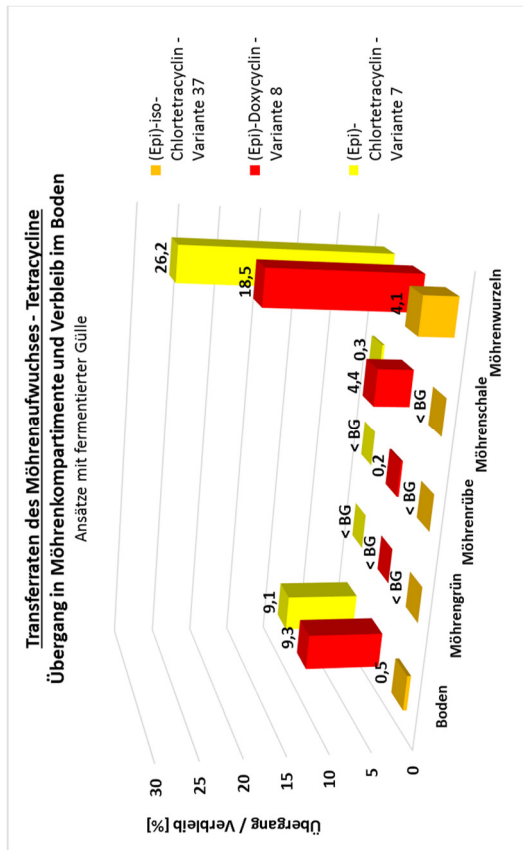


Abbildung 4-36: Bilanzierung des Möhrenaufwuchses unter Angabe der prozentualen Transferraten von dem Boden in die Pflanzenkompartimente und des prozentualen Verbleibs im Versuchsboden. Gegenüberstellung der Ansätze mit fermentierter Gülle.

Tabelle 4-17: Antibiotika-Transferraten vom Boden in die einzelnen Möhrenkompartimente und prozentualer Verbleib im Boden für Versuchsansätze mit fermentierter Rindergülle.

Variante	Analyt	Theoretische Antibiotikakonzentration im Boden nach Einarbeitung der Gülle [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Verbleib im Boden [%] ^a	Antibiotika-Transferraten vom Boden in die Möhren [%]				
				Möhrengrün	Möhrenrübe	Möhrenschale	Möhrenwurzeln	
7	(Epi)-CTC / (Epi)-iso-CTC	1061,5 / 3668,0	9,1 / 0,5	-	-	0,3	26,2 / 4,1	
8	(Epi)-DOX	4170,9	9,3	-	0,2	4,4	18,5	
9	SMX	-	-	-	-	-	-	
10	SMZ / N-Acetyl-SMZ	2814,5 / -	4,0	1,4 / 0,8	0,4	1,2	19,3 / 0,3	

^a Für die Berechnung wurde der mit der neu entwickelten Methode extrahierbare Anteil im Boden zugrunde gelegt.

4.4 Lysimeterstudien im Labormaßstab

Durch das Ausbringen von Wirtschaftsdüngern gelangen darin enthaltene Antibiotika oder deren Metabolite und Transformationsprodukte in die Umwelt. Über Lysimeterstudien im Labormaßstab sollte geklärt werden, wie sich Antibiotika im Boden verhalten. Eine Auswaschung der Substanzen bis in das Grundwasser (leaching), als auch ein Verbleib im Boden (Persistenzproblematik) ist denkbar. Hierzu wurden verschiedene Versuchsansätze mit Sand- und Lößböden, sowie unterschiedlichen Antibiotikakonzentrationen in der Gülle gewählt. Die Lysimeterstudie umfasste die Untersuchung der Bodeneluat als auch die Untersuchung der Bodenschichten im Abstand von 5 cm.

4.4.1 Untersuchung der Bodeneluat

Mögliche resultierende Grundwasserbelastungen, infolge von Gülleausbringung auf landwirtschaftlich genutzte Flächen, sollten im Hinblick auf Tetracycline und Sulfonamide anhand der Untersuchungsergebnisse der Bodeneluat abgeschätzt werden. Eine genaue Beschreibung des Versuchsaufbaus, sowie der Durchführung mit einer Auflistung der Varianten ist **Kapitel 3.7** zu entnehmen. Die Probenvorbereitung erfolgte gemäß der Versuchsvorschrift unter **Kapitel 3.11.2**. Die Messung der Proben erfolgte über einen Zeitraum von zwei Jahren.

Bodeneluat der „worst-case“ Versuchsansätze wurden zuerst untersucht. Die Lysimeterböden dieser Versuchsansätze wurden mit Gülle beaufschlagt, die vor der Fermentation mit 100 mg Antibiotikum je kg dotiert wurde. Lediglich in Bodeneluaten von Versuchsansätzen, deren Böden mit sulfamethazinhaltiger Gülle gedüngt wurden, konnten Positivbefunde ermittelt werden. Aufgrund dessen wurden die niedrigeren Dotierungen von 20 mg kg⁻¹ und 50 mg kg⁻¹ nur für Varianten mit Sulfamethazinzusatz untersucht.

Nach erfolgter Gülleaufgabe war die Substanz zeitnah (innerhalb des ersten Monats) im Bodeneluat nachweisbar. Je nach Bodentyp war das Durchbruchverhalten unterschiedlich. In Bodeneluaten von Lysimetern mit Volkmarser Sand waren die analysierten Gehalte zudem höher als in Bodeneluaten von Lysimetern mit Baunataler Löß.

Bei Versuchsansätzen mit Volkmarser Sandboden waren ab Monat eins Nachweise oberhalb der Bestimmungsgrenze von 1 ng L⁻¹ möglich. Bereits bei Monat vier zeigte die Durchbruchkurve für den 20 mg kg⁻¹ und 100 mg kg⁻¹ Versuchsansatz ein Maximum über den zweijährigen Untersuchungszeitraum. Bei dem „worst-case“-Ansatz mit 100 mg kg⁻¹ konnte am Maximum ein Gehalt von ca. 1.000 ng L⁻¹ bestimmt werden. Der 50 mg kg⁻¹ Versuchsansatz zeigte ein Durchbruchmaximum bei Monat fünf. Danach fiel die Sulfamethazinkonzentration in den Bodeneluaten kontinuierlich ab. Die Gehalte lagen dennoch auch nach zwei Jahren noch deutlich oberhalb der Bestimmungsgrenze von 1 ng L⁻¹ (**Abbildung 4-37**).

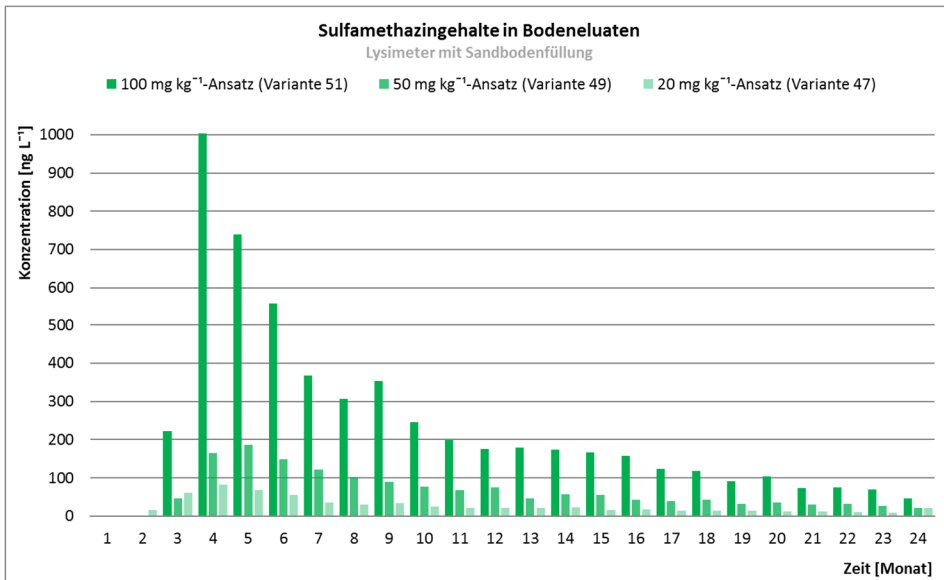


Abbildung 4-37: Sulfamethazingehalte in Bodeneluat der Varianten 47, 49 und 51 mit Volkmarser Sandboden über einen Beobachtungszeitraum von zwei Jahren ($n = 1$).

Bei Versuchsansätzen mit Baunataler Lößboden waren ebenfalls ab dem ersten Monat Sulfamethazinnachweise oberhalb der Bestimmungsgrenze von 1 ng L^{-1} möglich. Bereits bei Monat fünf zeigte die Durchbruchkurve für den 20 mg kg^{-1} und 100 mg kg^{-1} Versuchsansatz ein Maximum über den zweijährigen Untersuchungszeitraum. Der 50 mg kg^{-1} Versuchsansatz zeigte ein Durchbruchmaximum bei Monat sechs. Danach fiel die Sulfamethazinkonzentration in den Bodeneluat kontinuierlich ab, unterschritt über den Beobachtungszeitraum jedoch nie die Bestimmungsgrenze. Im Vergleich zu Ansätzen mit Sandboden, waren die nachgewiesenen Konzentrationen über die Untersuchungsperiode von zwei Jahren deutlich geringer. So war beispielsweise die Konzentration des „worst-case“-Ansatzes am Maximum mit ca. 160 ng L^{-1} um den Faktor 6 – 7 geringer (**Abbildung 4-38**).

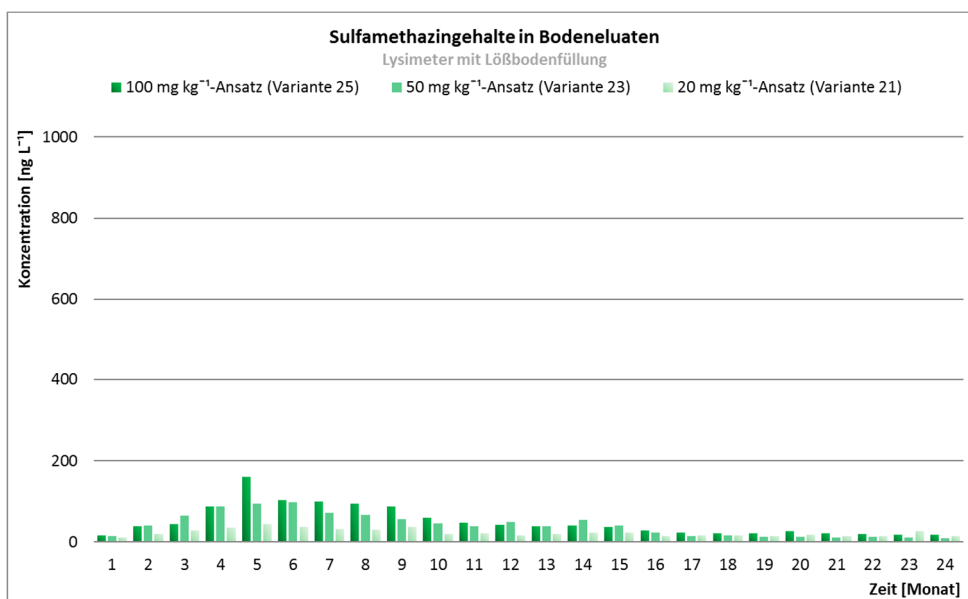


Abbildung 4-38: Sulfamethazingehalte in Bodeneluat der Varianten 21, 23 und 25 mit Baunataler Lößboden über einen Beobachtungszeitraum von zwei Jahren ($n = 1$).

In **Tabelle 4-18** sind die ermittelten Konzentrationen über einen Untersuchungszeitraum von zwei Jahren aufgeführt. Die Maxima der Durchbruchkurven sind farblich hinterlegt.

Tabelle 4-18: Zusammenstellung der Untersuchungsergebnisse für Bodeneluatate der Versuchsansätze mit Sulfamethazinaufgabe über Rindergülle.

Monat	Säule	Konz. [ng L ⁻¹]	Säule	Konz. [ng L ⁻¹]	Säule	Konz. [ng L ⁻¹]	Säule	Konz. [ng L ⁻¹]	Säule	Konz. [ng L ⁻¹]	Säule	Konz. [ng L ⁻¹]
1	Säule 21 – 20 mg kg ⁻¹ -Ansatz mit Baunataler Lößboden	10,7	Säule 23 – 50 mg kg ⁻¹ -Ansatz mit Baunataler Lößboden	14,4	Säule 25 – 100 mg kg ⁻¹ -Ansatz mit Baunataler Lößboden	16,6	Säule 47 – 20 mg kg ⁻¹ -Ansatz mit Volkmarser Sandboden	1,0	Säule 49 – 50 mg kg ⁻¹ -Ansatz mit Volkmarser Sandboden	0,6*	Säule 51 – 100 mg kg ⁻¹ -Ansatz mit Volkmarser Sandboden	0,7*
2		20,4		40,0		38,5		16,7		1,3		1,3
3		28,3		65,2		43,5		60,7		47,1		221,9
4		35,5		87,9		88,1		82,4		164,2		1003,1
5		44,1		94,9		160,8		68,3		187,0		739,7
6		37,4		97,4		103,6		55,1		148,0		556,1
7		31,4		71,7		100,2		36,6		121,6		367,4
8		30,2		66,2		93,6		29,8		101,6		306,8
9		36,3		55,6		86,8		33,2		90,2		354,3
10		19,8		45,9		59,1		24,9		76,8		246,6
11		20,8		39,6		46,7		21,3		68,6		199,1
12		16,9		49,6		42,1		21,3		75,0		176,4
13		19,3		38,9		38,9		20,5		46,8		180,0
14		23,7		54,5		40,3		22,8		56,4		174,1
15		22,5		40,4		36,7		16,8		55,8		166,0
16		15,2		23,9		27,9		17,4		42,2		157,8
17		16,3		14,9		22,6		14,9		38,8		123,2
18		16,6		16,8		21,6		14,9		42,3		118,5
19		14,9		11,9		20,5		14,8		32,7		92,2
20		17,6		13,3		25,9		11,9		35,8		103,9
21		14,7		10,7		21,0		12,8		30,8		72,8
22		15,0		11,9		19,9		11,0		32,0		75,7
23		25,9		10,2		17,6		9,6		27,1		69,5
24		13,8		9,6		18,4		21,6		22,0		47,3

* < Bestimmungsgrenze

4.4.2 Untersuchung der Bodenschichten

Die Untersuchung der Lysimeterböden sollte zeigen, ob insbesondere die Tetracycline, welche nicht in den Bodeneluat nachweisbar waren, im Boden aufzufinden sind. Die schichtweise Untersuchung sollte ferner klären, ob die Substanzen im Oberboden persistieren oder bereits in tiefere Bodenschichten verlagert wurden und demnach auch eine mögliche Belastung des Grundwassers darstellen könnten. Die Durchführung zum Erhalt der Bodenschichten ist in **Kapitel 3.7.1.3** und **3.7.1.4** detailliert beschrieben. Für die Untersuchung wurden Rohre der 100 mg kg^{-1} -Ansätze herangezogen (Volkmarser Sand: Säule 33, 39, 45 und 51; Baunataler Löß: Säule 7, 13, 19 und 25). Pro Rohr ergaben sich neun Schnittproben. Eine Übersicht der Proben ist in **Tabelle 3-14** aufgeführt. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach der in **Kapitel 3.10.4.2** aufgeführten Versuchsvorschrift in Dreifachbestimmung. Hierzu wurde die homogenisierte Bodenfrischmasse herangezogen. Die Ergebnisse wurden im Anschluss auf die Trockenmasse umgerechnet. Deren Bestimmung erfolgte gemäß den Ausführungen in **Kapitel 3.5**. In **Abbildung 4-39** ist die Antibiotikaverlagerung in Lysimetern mit Sandbodenfüllung dargestellt, in **Abbildung 4-40** die Verlagerung der Antibiotika in Lysimetern mit Lößbodenfüllung.

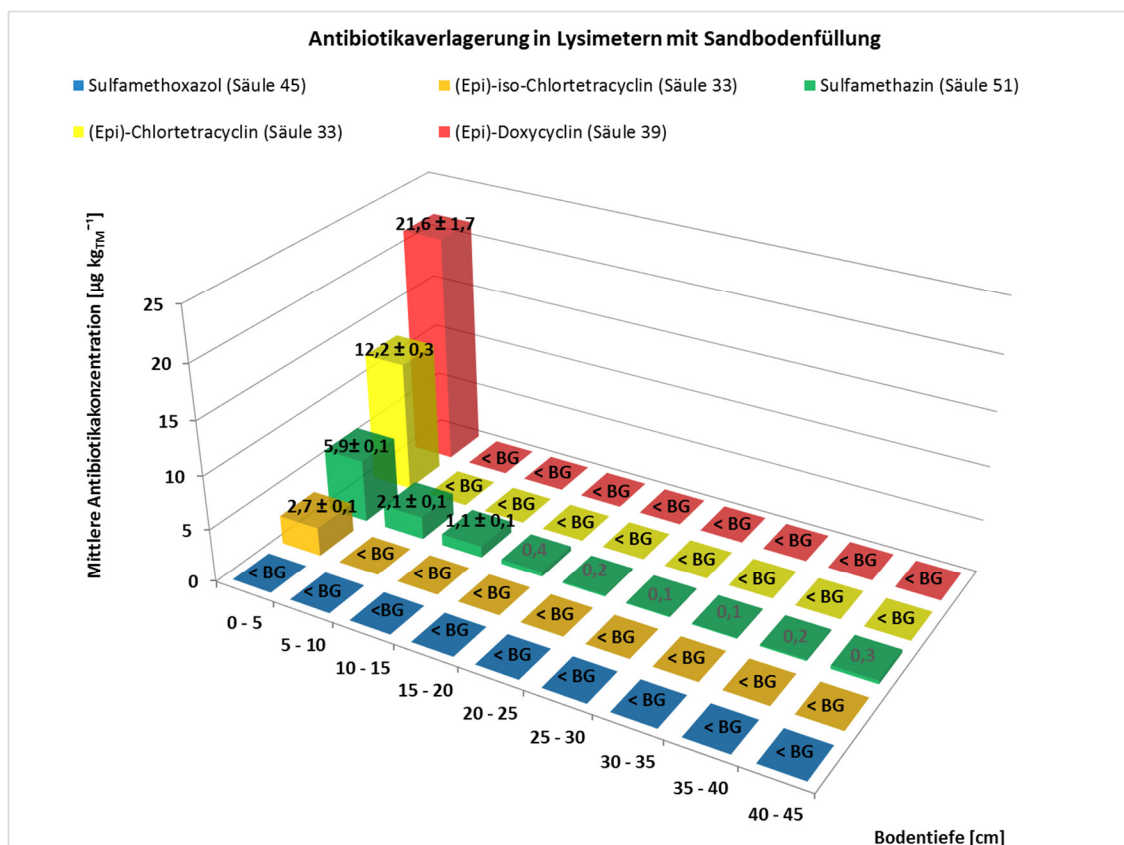


Abbildung 4-39: Antibiotikaverlagerung in Lysimetern mit Volkmarser Sandboden. Untersucht wurden neun Bodenschichten in einem Abstand von 5 cm. Aufgeführt sind die gemittelten Konzentrationen in $\mu\text{g kg}^{-1}$ Trockenmasse \pm der Standardabweichung ($n = 3$).

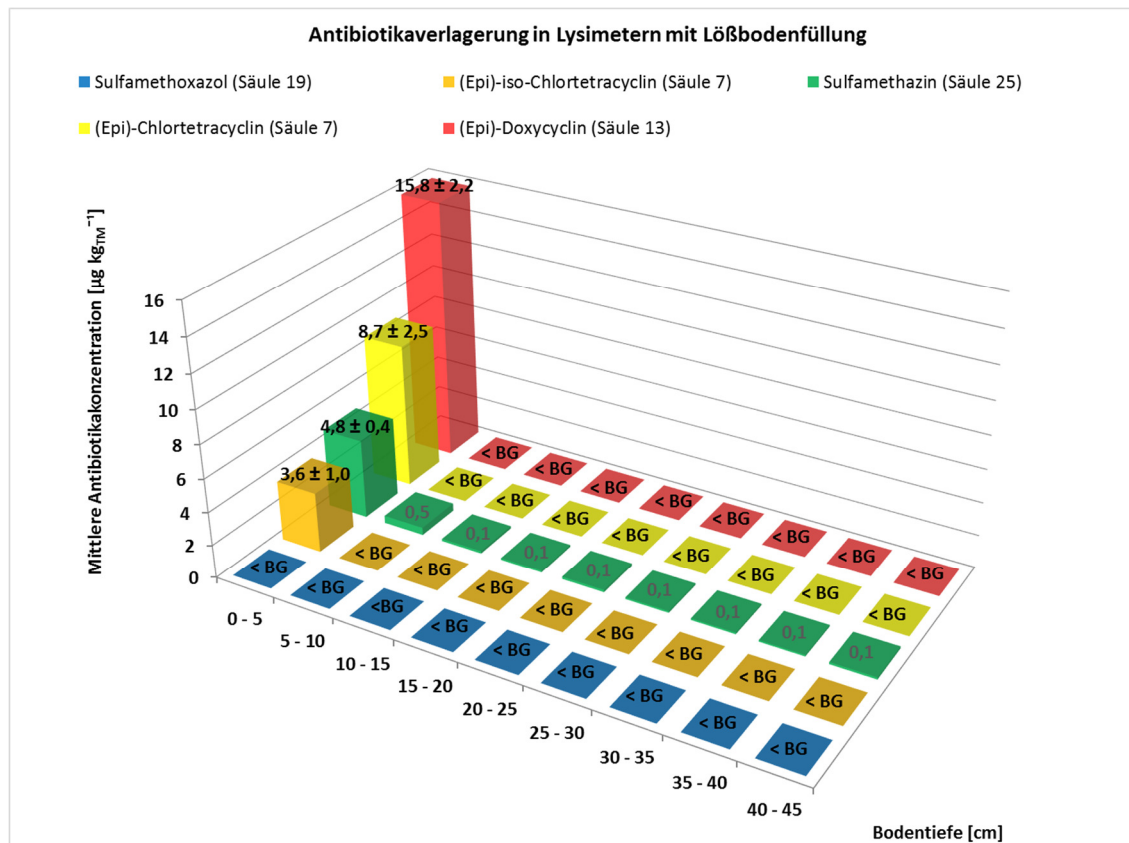


Abbildung 4-40: Antibiotikaverlagerung in Lysimetern mit Baunataler Lößboden. Untersucht wurden neun Bodenschichten in einem Abstand von 5 cm. Aufgeführt sind die gemittelten Konzentrationen in $\mu\text{g kg}^{-1}$ Trockenmasse \pm der Standardabweichung ($n = 3$).

Sulfamethoxazol war weder in den Bodeneluatens noch in den beiden Versuchsböden der Lysimeter nachweisbar. Für die Lysimeterversuche wurden die gleichen Gülle verwendet, wie für den Weidelgrasaufwuchs. Wie **Tabelle B-3** zu entnehmen, war nach der 35-tägigen Fermentation kein Sulfamethoxazol mehr in der Gülle oberhalb der Bestimmungsgrenze von $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ nachweisbar. Dies könnte der Grund dafür sein, dass dieser Wirkstoff nicht in den Bodeneluatens und den Böden aus den Lysimeterrohren nachweisbar war. Eine Diskussion folgt in **Kapitel 5.3 und 5.5**.

Sulfamethazin zeigte im Verlauf der Fermentation ein anderes Eliminierungsverhalten. Der Wirkstoff unterlag einer Eliminierung von ca. 30 %. Ein Eintrag dieses Wirkstoffes über die fermentierte Rindergülle fand somit statt. Sulfamethazin wurde in allen neun Bodenschichten sowohl im Sand- als auch im Lößboden nachgewiesen. Dies wird auch durch das Auffinden der Substanz in den Bodeneluatens untermauert, was ein vollständiges Durchdringen der Böden mit Antibiotika voraussetzt. Lediglich die Verteilung in den Bodenschichten war verschieden und bodenspezifisch. Bis zu einer Tiefe von 15 cm lagen die Gehalte im Sandboden oberhalb der Bestimmungsgrenze von $1 \mu\text{g kg}^{-1}$. Die höchste Sulfamethazinkonzentration war in der obersten Bodenschicht (Bodentiefe 0 bis 5 cm) mit $5,9 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ nachweisbar. Im Lößboden war nur

bis zu einer Tiefe von 5 cm ein Nachweis oberhalb der Bestimmungsgrenze gegeben. Der Gehalt betrug hier $4,8 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$. In den darunterliegenden Schichten konnte Sulfamethazin dennoch identifiziert werden.

Die beiden Tetracycline (Epi)-Chlortetracyclin und (Epi)-Doxycyclin waren nicht in den Bodeneluat nachweisbar. Die Untersuchung der Bodenschichten zeigte, dass sich diese Substanzen im Oberboden aufhalten. Beide Substanzen waren sowohl beim Sand-, als auch beim Lößboden lediglich bis in 5 cm Tiefe vorgedrungen. In tiefere Bodenschichten konnte diese Wirkstoffgruppe nicht ausgewaschen werden. Man kann von einer starken Sorption im Oberboden ausgehen. Dennoch muss diese Gruppe kritisch in Bezug auf ihre Umweltrelevanz betrachtet werden. Eine nähere Ausführung hierzu folgt in **Kapitel 5.5**. Der Gehalt an (Epi)-Doxycyclin im Oberboden war mit $21,6 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ im Sandboden und $15,8 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ im Lößboden am höchsten, gefolgt von (Epi)-Chlortetracyclin mit $12,2 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ im Sandboden und $8,7 \mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ im Lößboden.

Neben (Epi)-Chlortetracyclin war auch dessen Transformationsprodukt (Epi)-iso-Chlortetracyclin im Oberboden bis 5 cm Tiefe nachweisbar. Der Eintrag dieser Substanz in den Boden erfolgte über die fermentierte Rindergülle. Im Verlauf der Fermentation kam es zu einem Abbau an (Epi)-Chlortetracyclin, welcher mit einer Bildung von (Epi)-iso-Chlortetracyclin korrelierte (vgl. hierzu **Tabelle B-4**).

In **Tabelle B-12** ist eine Ergebnisübersicht der nachgewiesenen Antibiotika in den einzelnen Bodenschichten mit Angabe der Standardabweichung der Dreifachaufarbeitung zusammengestellt.

Beiden Wirkstoffgruppen gemein ist eine Anreicherung und Persistenz im Oberboden. Nur geringe Mengen Sulfamethazin drangen bis in die Bodeneluate vor.

4.4.3 Bilanzierung der Lysimeterstudie

Im Zuge einer Bilanzierung sollte der prozentuale Übergang der Antibiotika aus oberflächlich aufgebrachtter Gülle in Bodeneluat geklärt werden, nachdem der Boden zur Regensimulation täglich mit 10 mL deionisiertem Wasser bewässert wurde. Zudem sollte der prozentuale Verbleib in den einzelnen Bodenschichten ermittelt werden. Aus diesen Daten können Antibiotikabelastungen des Grundwassers und Belastungen der landwirtschaftlichen Nutzböden im Hinblick auf die beiden Wirkstoffgruppen Sulfonamide und Tetracycline abgeschätzt werden.

Im Rahmen der Untersuchungen zu dem Weidelgrasprojekt, wurde auch die fermentierte Gülle untersucht, welche zudem für die Lysimeterstudien Verwendung fand (**Tabelle B-3** und **Tabelle B-4**). Aus den analysierten Antibiotikakonzentrationen nach durchgeführter Fermentation wurde der tatsächlich über die Gülle in den Versuchsboden eingetragene absolute Antibiotikagehalt berechnet. Dieser Gehalt stand theoretisch für eine Verfrachtung mit dem aufgegebenen Wasser über die Bodenpassage in untere Bodenschichten und bis hinein in die Bodeneluat zur Verfügung. Pro Lysimeterrohr wurden 16 g Gülle aufgebracht. Diese Menge richtete sich nach dem Stickstoffgehalt der Gülle und entsprach den gesetzlichen Vorgaben der DüV (vgl. hierzu **Kapitel 3.7.1.3**) (DüV, 2017). Neben der theoretischen Antibiotikakonzentration im Boden nach der Gülleaufgabe, wurde auch der insgesamt bestimmte absolute Antibiotikagehalt in den Bodeneluat für die Bilanzierung berechnet. Aus diesen beiden Angaben wurde der prozentuale Übergang ermittelt. **Tabelle 4-19** fasst die Kenngrößen und den daraus berechneten prozentualen Übergang für die Varianten mit Sulfamethazinzugabe zusammen.

Tabelle 4-19: Bilanzierung der Lysimeterstudie. Prozentualer Übergang von Sulfamethazin in die Bodeneluat aus Versuchsansätzen mit Sandboden und Lößboden.

Variante	Analyt	Theoretische absolute Antibiotikakonzentration im Boden nach Einarbeitung der Gülle [µg]	Summe des absoluten Antibiotikagehaltes in den Bodeneluat [ng]	Übergang in die Bodeneluat [%]
21 (Löß)	SMZ	233,6	103,5	0,04
23 (Löß)	SMZ	593,6	186,4	0,03
25 (Löß)	SMZ	1131,2	221,3	0,02
47 (Sand)	SMZ	233,6	116,1	0,05
49 (Sand)	SMZ	593,6	287,9	0,05
51 (Sand)	SMZ	1131,2	1026,2	0,09

Über einen Beobachtungszeitraum von zwei Jahren konnte lediglich Sulfamethazin in den Bodeneluat nachgewiesen werden. Die anderen drei Antibiotika Sulfamethoxazol, (Epi)-Chlortetracyclin und (Epi)-Doxycyclin waren nicht nachweisbar. Sulfamethazin zeigte sich bereits

bei den Aufwuchsstudien als vergleichsweise mobile Substanz, die bis in die Weidelgrashalme und das Möhregrün transportiert wurde (**Tabelle 4-14**, **Tabelle 4-16** und **Tabelle 4-17**).

Der prozentuale Übergang von Sulfamethazin in die Bodeneluat der Lysimeter betrug weniger als 1 % der ursprünglich über Gülle eingetragenen Wirkstoffkonzentration. In Bodeneluat, welche von Lysimetern mit Baunataler Lößboden stammten, konnten 0,02 % bis 0,04 % der ursprünglich aufgebrauchten Sulfamethazinkonzentration innerhalb von zwei Jahren wiedergefunden werden. In Bodeneluat von Lysimetern mit Volkmarser Sandboden wurden etwas höhere Übergangsraten von 0,05 % bis 0,09 % ermittelt.

Für die Varianten mit einer Wirkstoffzugabe von $100 \text{ mg kg}_{\text{Gülle}}^{-1}$, wurde der prozentuale Verbleib der Antibiotika in dem Boden ermittelt. Nach 31 Monaten wurden die Lysimeterrohre hierzu abgebaut. Die Böden aus den Lysimeterrohren wurden schichtweise auf ihren Antibiotikagehalt analysiert (**Tabelle B-12**). Der analysierte Gehalt wurde unter Einbeziehung der Bodenauswaage (**Tabelle 3-14**) und der Trockenmasse (digitaler Anhang) in einen Absolutwert umgerechnet. Dieser Wert wurde auf den theoretischen Antibiotikagehalt im Boden nach der Gülleaufgabe bezogen. Der so ermittelte prozentuale Verbleib ist in **Tabelle 4-20** aufgeführt.

Vom Zeitpunkt der Gülleapplikation im Juni 2014 bis zur Analyse der Böden im Januar 2017, waren die Lysimeterrohre im Labor bei Raumtemperatur aufgestellt. In Lysimetern mit Lößbodenfüllung konnten nach 945 Tagen noch 0,4 % (Epi)-Chlortetracyclin, 0,1 % (Epi)-iso-Chlortetracyclin, 0,3 % (Epi)-Doxycyclin und 0,1 % Sulfamethazin wiedergefunden werden. In den Sandböden waren etwas höhere Rückstandsmengen aufzufinden. Jeweils 0,5 % (Epi)-Chlortetracyclin und (Epi)-Doxycyclin, sowie 0,1 % (Epi)-iso-Chlortetracyclin und 0,2 % Sulfamethazin verblieben im Sandboden.

Tabelle 4-20: Bilanzierung der Lysimeterstudie. Prozentualer Verbleib der Zielanalyten in den Lysimeterböden aus den 100 mg kg^{-1} - Versuchsansätzen.

Variante	Analyt	Theoretische absolute Antibiotikakonzentration im Boden nach Einarbeitung der Gülle [μg]	Übergang in den Boden [%]
7 (Löß)	(Epi)-CTC / (Epi)-iso-CTC	612,8 / 987,2	0,4 / 0,1
13 (Löß)	(Epi)-DOX	1227,2	0,3
19 (Löß)	SMX	-	-
25 (Löß)	SMZ	1131,2	0,1
33 (Sand)	(Epi)-CTC / (Epi)-iso-CTC	612,8 / 987,2	0,5 / 0,1
39 (Sand)	(Epi)-DOX	1227,2	0,5
45 (Sand)	SMX	-	-
51 (Sand)	SMZ	1131,2	0,2

4.5 Routineanalytik - Grundwassermessprogramm

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 689 Grundwasserproben von unterschiedlichen Grundwassermessstellen in Hessen auf ihren Gehalt an Tetracyclinen ((Epi)-Chlortetracyclin, (Epi)-Doxycyclin) und Sulfonamiden (Sulfamethazin, Sulfamethoxazol) untersucht. Die Proben wurden im Auftrag des Hessischen Landesamtes für Naturschutz, Umwelt und Geologie (HLNUG) analysiert. Gemäß den Forderungen des Auftraggebers sollten Bestimmungsgrenzen von 50 ng L^{-1} eingehalten werden. Dies war über eine Direktinjektion der Proben mit massenspektrometrischer Detektion möglich. Die Versuchsvorschrift ist in **Kapitel 3.11.1** aufgeführt. Neben den vier vom Auftraggeber gewünschten Zielanalyten, wurde die Methode um relevante Metabolite und Transformationsprodukte erweitert. Hierzu zählten *N*-Acetyl-Sulfamethazin, *N*-Acetyl-Sulfamethoxazol und (Epi)-iso-Chlortetracyclin.

Im Jahr 2016 waren in 96 % der untersuchten Grundwasserproben keine Rückstände der ausgewählten Wirkstoffe oberhalb einer Nachweisgrenze von 20 ng L^{-1} bzw. oberhalb einer Bestimmungsgrenze von 50 ng L^{-1} nachweisbar (**Abbildung 4-41** und **Tabelle 4-21**). Mehr als die Hälfte der Proben mit Positivbefunden wiesen Rückstände an Sulfamethoxazol auf (2,6 % von 4 %). Der Median lag für diesen Wirkstoff bei 85 ng L^{-1} und in einer Probe konnte ein Maximalwert von 693 ng L^{-1} bestimmt werden. (Epi)-iso-Chlortetracyclin war mit einem Anteil von 0,8 % in den Grundwasserproben auffindbar. Trotz des geringen Vorkommens lagen die analysierten Gehalte von 1.473 ng L^{-1} und 834 ng L^{-1} weit über der Bestimmungsgrenze. (Epi)-Chlortetracyclin und (Epi)-Doxycyclin konnten jeweils in 0,3 % der Grundwasserproben nachgewiesen werden.

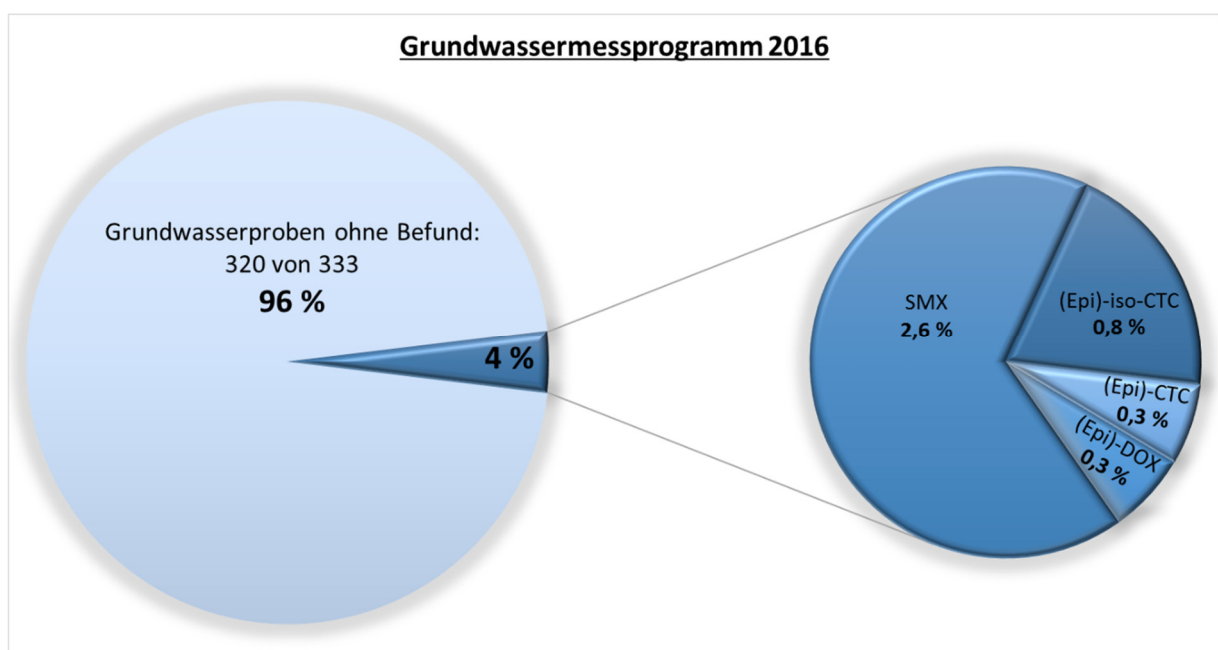


Abbildung 4-41: Ergebnisse des Screenings von Grundwasserproben im Jahr 2016.

Tabelle 4-21: Zusammenstellung der Antibiotikagehalte in Grundwasserproben des Jahres 2016.

Probe	(Epi)-CTC [ng L ⁻¹]	(Epi)-DOX [ng L ⁻¹]	SMZ [ng L ⁻¹]	SMX [ng L ⁻¹]	(Epi)-iso-CTC [ng L ⁻¹]	N-Ac-SMZ [ng L ⁻¹]	N-Ac-SMX [ng L ⁻¹]
Messwert > Bestimmungsgrenze							
1	100,6				1473,2		
2					834,1		
3				65,8			
4				66,5			
5				67,1			
6				85,0			
7				98,1			
8				139,4			
9				693,0			
Nachweisgrenze < Messwert < Bestimmungsgrenze							
10		< BG (27,6)			< BG (22,4)		
11				< BG (22,6)			
12				< BG (31,0)			
13				< BG (45,0)			

Im Jahr 2017 waren ebenfalls in 96 % der untersuchten Grundwasserproben keine Rückstände der ausgewählten Wirkstoffe oberhalb einer Nachweisgrenze von 20 ng L⁻¹ bzw. oberhalb einer Bestimmungsgrenze von 50 ng L⁻¹ nachweisbar (**Abbildung 4-42** und **Tabelle 4-22**). Sulfonamide machten auch hier den größten Anteil der Positivbefunde aus. Sulfamethoxazol konnte am häufigsten im Grundwasser quantifiziert werden. Der Wirkstoff war in 2 % der Grundwasserproben nachweisbar. Der Median für diesen Wirkstoff lag bei 62,5 ng L⁻¹. In einer Probe konnte ein Maximalwert von 1.702 ng L⁻¹ analysiert werden. Sulfamethazin, sowie die beiden Tetracycline (Epi)-Doxycyclin und (Epi)-Chlortetracyclin konnten in keiner der analysierten Proben oberhalb der Bestimmungsgrenze nachgewiesen werden. Lediglich in zwei Proben war das Transformationsprodukt (Epi)-iso-Chlortetracyclin unterhalb der Bestimmungsgrenze identifizierbar. Im Gegensatz zum Vorjahr waren die beiden Metabolite *N*-Acetyl-Sulfamethazin und *N*-Acetyl-Sulfamethoxazol in insgesamt vier Proben nachweisbar. Eine dieser Proben wies einen Gehalt an *N*-Acetyl-Sulfamethoxazol oberhalb der Bestimmungsgrenze auf. In dieser Probe war zudem auch die Ursprungssubstanz Sulfamethoxazol mit 54,9 ng L⁻¹ enthalten.

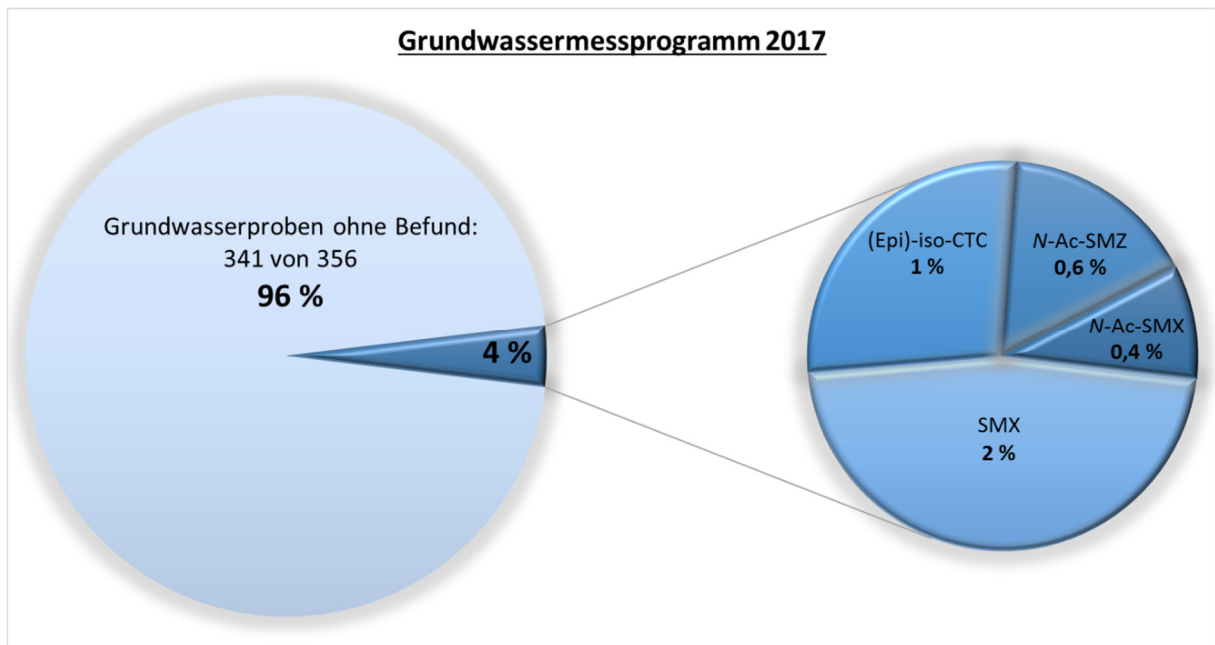


Abbildung 4-42: Ergebnisse des Screenings von Grundwasserproben im Jahr 2017.

Tabelle 4-22: Zusammenstellung der Antibiotikagehalte in Grundwasserproben des Jahres 2017.

Probe	(Epi)-CTC [ng L ⁻¹]	(Epi)-DOX [ng L ⁻¹]	SMZ [ng L ⁻¹]	SMX [ng L ⁻¹]	(Epi)-iso-CTC [ng L ⁻¹]	N-Ac-SMZ [ng L ⁻¹]	N-Ac-SMX [ng L ⁻¹]
Messwert > Bestimmungsgrenze							
1				50,4			
2				54,9			
3				61,8			
4				62,5			
5				68,7			
6				117,1			
7				1702,9			113,8
Nachweisgrenze < Messwert < Bestimmungsgrenze							
8					< BG (27,3)		< BG (30,1)
9						< BG (21,0)	
10						< BG (21,8)	< BG (21,8)
11				< BG (25,2)			
12				< BG (37,1)			
13					< BG (48,6)		

5 Diskussion

Antibiotika gelangen über verschiedene Eintragspfade in die Umwelt (**Abbildung 1-2**). Die Studien der vorliegenden Arbeit fokussieren sich auf den Umwelteintrag von Sulfonamiden und Tetracyclinen, die seit vielen Jahren eine vielfältige Anwendung in der Veterinärmedizin finden. Als Haupteintragsquelle aus diesem Anwendungsbereich zählt Gülle aus der intensiven Nutztierhaltung, welche die Antibiotika in ihrer ursprünglichen oder metabolisierten Form enthält. Durch die Verwendung von Gülle als Düngemittel gelangen die Substanzen in landwirtschaftliche Nutzflächen und können aus dem Gülle-Boden-Gemisch weiter verlagert werden. Der Verbleib von Antibiotika in der Umwelt ist vielseitig. So spielen Abbau- und Transformationsprozesse, Auswaschung, Infiltration, Sorption und Aufnahme in Pflanzen eine entscheidende Rolle (Du and Liu, 2012; Meena et al., 2015). Für das Umweltverhalten sind insbesondere die chemischen Eigenschaften der Wirkstoffe, sowie die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Bodens und klimatische Bedingungen von maßgebender Bedeutung. Auch die Art der Güllevorbehandlung kann einen Einfluss nehmen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden umfangreiche systematische Studien in Form von Aufwuchs- und Lysimeterversuchen durchgeführt, um insbesondere das Aufnahmeverhalten in Pflanzen und den Versickerungsprozess in das Grundwasser näher zu untersuchen. Auch die routinemäßige Grundwasseruntersuchung auf Antibiotikarückstände im Rahmen des Grundwassermessprogrammes des HLNUG wurde parallel vorgenommen.

Im Folgenden werden die erhobenen Ergebnisse im Kontext mit Daten aus der Literatur diskutiert, um die anfangs festgelegten Untersuchungsziele (**Abbildung 5-1**) einzuordnen.

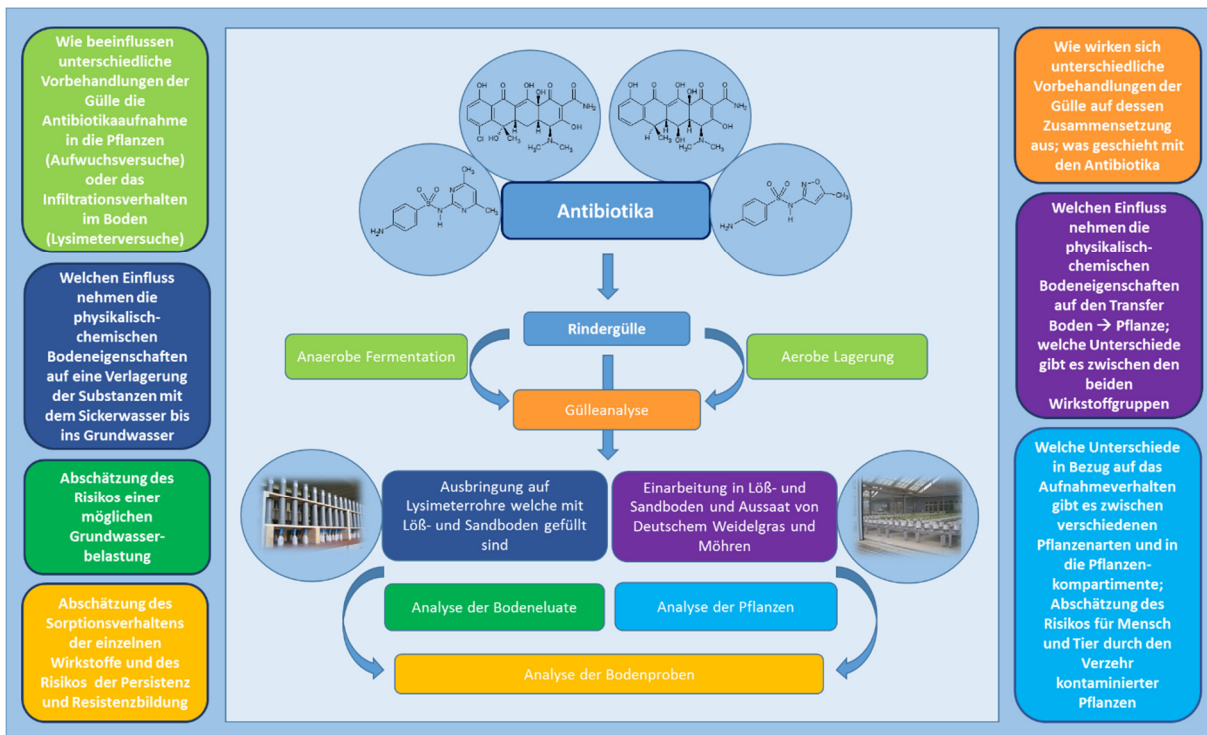


Abbildung 5-1: Umfang und Ziele der Untersuchung des Transfers von Antibiotika aus gülle-gedüngten Böden in Pflanzen und in das Grundwasser.

5.1 Einordnung der entwickelten Methoden in den Kontext der Literatur

Ein grundlegendes Ergebnis der vorliegenden Arbeit stellt die Entwicklung und Optimierung von Analysemethoden zur simultanen Bestimmung von Tetracyclinen ((Epi)-CTC, (Epi)-iso-CTC, (Epi)-DOX) und Sulfonamiden (SMZ, SMX, *N*-Acetyl-SMZ, *N*-Acetyl-SMX) in insgesamt zehn Umwelt-, Lebensmittel- und Futtermittelproben mittels UHPLC-MS/MS dar.

Bei den gewählten Analyten handelt es sich um zwei unterschiedliche Wirkstoffgruppen, die sich u.a. im Hinblick auf ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften unterscheiden. Die Entwicklung einer Multimethode stellt somit eine große analytische Herausforderung dar. Auch die zur Untersuchung herangezogenen Matrices sind sehr komplex und Matrix-Effekte müssen insbesondere für feststoffreiche Proben und matrixreiche Bodeneluate im Zuge der Methodenentwicklung Berücksichtigung finden.

In der Literatur aufgeführte Probenvorbereitungsmethoden für die Extraktion von Tetracyclinen und Sulfonamiden aus Umwelt- und Lebensmittelproben basieren häufig auf Fest-Flüssig-, Flüssig-Flüssig- (Spielmeyer et al., 2014), Ultraschall- (Feng et al., 2016; Zhou et al., 2012), Druckflüssigkeits- (Andreu et al., 2009; García-Galán et al., 2013; Jacobsen et al., 2004; Schlüsener et al., 2003) oder Mikrowellenextraktionen (Hu et al., 2010a). Überwiegend kommen Mischungen aus organischen Lösungsmitteln (Methanol, Acetonitril, Aceton, Dichlormethan) und wässrigen Puffern (z.B. Citrat-Puffer, McIlvaine-Puffer) mit Komplexbildnern (z.B. EDTA) als Extraktionsmittel zum Einsatz (Arikan, 2008; Berendsen et al., 2015) (**Tabelle C-2**). Dem Extraktionsschritt folgt häufig eine Anreicherung und Aufreinigung des erhaltenen Probenextraktes über Festphasenextraktion (SPE) (Jacobsen and Halling-Sørensen, 2006). Methoden ohne weiteren Probenvorbereitungsschritt wurden ebenfalls beschrieben (Haller et al., 2002; Hamscher et al., 2005a; Hamscher et al., 2002). Für die spätere Analyse der erhaltenen Probenextrakte haben sich im Laufe der Jahre hauptsächlich LC-MS/MS-Methoden etabliert (Hamscher et al., 2002; Shelver and Varel, 2012).

Im Rahmen der Methodenentwicklung und Optimierung dieser Arbeit wurden wässrige Puffersysteme unterschiedlicher pH-Werte und EDTA-Konzentrationen, sowie verschiedene Lösungsmittel getestet (**Abbildung 4-1, Abbildung 4-2**). Für die Extraktionsversuche wurde Rindergülle verwendet. In der Literatur wurde vielfach gezeigt, dass die Extraktion von Sulfonamiden aus Gülle und Pflanzen durch die Verwendung von Lösungsmitteln sehr gut zu realisieren ist (Białk-Bielińska et al., 2009; Tetzner et al., 2016). Auch in dieser Arbeit konnte dies bestätigt werden. Die Wiederfindungen dotierter Gülleproben gegen Lösungsmittelstandards der gleichen Analytkonzentration betragen bei Verwendung von Methanol, Acetonitril oder Aceton als Extraktionsmittel $\geq 90\%$. Für die simultane Extraktion von Sulfonamiden und Tetracyclinen waren Lösungsmittel jedoch nicht ausreichend. Aufgrund der starken Neigung von Tetracyclinen zur Bildung von Komplexen mit mehrwertigen Kationen in der Matrix (vgl. hierzu **Kapitel 5.3** und dort aufgeführte Literatur), ist der Zusatz von Komplexbildnern von entscheidender Bedeutung und auch in der Literatur mehrfach beschrieben (Chen et al., 2012;

Spielmeyer et al., 2014) um die Extraktionseffizienz für Tetracycline zu steigern. Neben Matrix-Interaktionen können abhängig von dem umgebenden pH-Wert – bedingt durch das Extraktionsmittel – und der Extraktionstemperatur Epimerisierungs- und Isomerisierungsreaktionen der Tetracycline auftreten. Als geeignetes Extraktionsmittel zum simultanen Nachweis von Tetracyclinen und Sulfonamiden erwies sich McIlvaine-Puffer pH 4 mit 0,05 M EDTA-Zusatz. Im Unterschied zu anderen Methoden, die überwiegend Lösungsmittel oder Mischungen aus McIlvaine-Puffer mit EDTA-Zusatz und Lösungsmitteln für die Extraktion von Tetracyclinen und Sulfonamiden aus Gülle und Pflanzen verwenden (**Tabelle C-2**), konnte im Rahmen der Methodenentwicklung dieser Arbeit eine Steigerung der Extraktionsausbeuten allein durch die Erhöhung der Extraktionstemperatur auf 40 °C und der Anwendung von Ultraschall erreicht werden. Im Sinne eines vorbeugenden Umwelt- und Arbeitsschutzes ist die Verwendung wässriger Extraktionsmittel generell bei ähnlicher Extraktionsausbeute organischen Lösungsmitteln vorzuziehen. Im Extraktionsmittelgemisch vorhandenes organisches Lösungsmittel wäre zudem für die nachfolgende Probenanreicherung und –aufkonzentrierung über Festphasenextraktion an C₁₈-Materialien unerwünscht, da Lösungsmittelrückstände zu Analytverlusten beitragen könnten. Vor der SPE müsste somit ein zusätzlicher Probenvorbereitungsschritt zur Entfernung des Lösungsmittels beispielsweise über einen Stickstoffkonzentrator erfolgen oder der Lösungsmittelanteil durch Verdünnung mit Wasser minimiert werden. Die Extraktionsbedingungen wurden gewählt, da anhand verschiedener Testansätze belegt werden konnte, dass bei pH 4 und 40 °C keine Umwandlung von (Epi)-Chlortetracyclin in (Epi)-iso-Chlortetracyclin erfolgte (**Abbildung 4-2**, **Abbildung 4-4**). Somit kann ein Nachweis von (Epi)-iso-Chlortetracyclin auf das Vorkommen dieser Substanz in der jeweiligen Probenmatrix hindeuten und steht nicht im Zusammenhang mit der Probenvorbereitung. Die Epimerbildung findet in einem pH-Bereich von 2 – 6 statt. Unter den gewählten Versuchsbedingungen ist daher von einer Epimerisierung der Tetracycline auszugehen. Daher wurden auch die Epimere in die Methode implementiert und die Gehalte als Summe der Ursprungssubstanz und dessen Epimer angegeben.

Für amphotere Wirkstoffe, die abhängig von dem umgebenden pH-Wert dissoziiert vorliegen können (vgl. **Kapitel 5.4**) sind SPE-Materialien geeignet, die einen breiten pH-Bereich abdecken und somit für neutrale, basische und saure Verbindungen anwendbar sind. Für die Anreicherung der Analyte über SPE wurden in dieser Arbeit nach verschiedenen Tests Strata-X-Kartuschen verwendet (**Abbildung 4-7**, **Abbildung 4-8**). In der Literatur kommen überwiegend diese Kartuschen (Chitescu et al., 2013) oder Oasis-HLB-Kartuschen zum Einsatz (Ahmed et al., 2015; Azanu et al., 2016; Carter et al., 2014). Im Rahmen der durchgeführten Methodenentwicklung führten beide Kartuschen zu vergleichbaren Analytwiederfindungen. Der Probenfluss über die Strata-X-Kartuschen erfolgte jedoch schneller, sodass sich aufgrund des hohen Probenaufkommens für diese Kartuschen entschieden wurde. Die entwickelte Probenvorbereitungsmethode für Gülle konnte auf die Matrices Weidelgras, Möhrenrübe, Möhrenschele, Möhrengrün und Möhrenwurzeln übertragen werden. Auch Antibiotikarückstände in Schweinemuskulatur und Honig konnten im Rahmen von Ringversuchen erfolgreich mit der neuen Methode analysiert werden, was deren Robustheit belegt. Lediglich für die Matrix Boden

war eine Modifizierung der Extraktionsmittel erforderlich. Eine Mischung aus McIlvaine-Puffer pH 6 und Methanol (1:5, v/v) erwies sich hierbei als geeignet. Die Extraktion erfolgte im Ultraschallbad bei 60 °C. Auch Gans et al. und Martínez-Carballo et al. verwendeten die aufgeführten Extraktionsmittel zur Extraktion von Antibiotika aus Böden (Gans et al., 2010; Martínez-Carballo et al., 2007). Die drastischeren Extraktionsbedingungen basieren auf den starken Wechselwirkungen der Analyte mit der Bodenmatrix (vgl. **Kapitel 5.3**). Auf eine Festphasenextraktion wurde beim Boden verzichtet, da nach dem Eindampfen des Methanols bereits Bestimmungsgrenzen von $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ erreicht werden konnten.

Ein Vorteil der entwickelten Methode ist das Auskommen mit geringen Lösungsmittelmengen. Die erhaltenen Bestimmungsgrenzen sind mit anderen Methoden, welche größere Lösungsmittelmengen einsetzen vergleichbar (**Tabelle C-2**) und liegen im Bereich von $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ bis $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ (**Kapitel 4.2**). Nur vereinzelt konnten geringere Bestimmungsgrenzen durch den Einsatz von Druckflüssigkeitsextraktionen unter deutlich höheren Temperaturen erreicht werden (Franklin et al. 2016). Für Tetracycline, die abhängig von der Temperatur Zersetzungs- und Umwandlungsreaktionen unterliegen, sind solche Verfahren jedoch nicht geeignet.

Die Wiederfindungen wurden über eine Matrixkalibrierung bestimmt und lagen für die genannten feststoffreichen Matrices im Bereich von 94 % und 110 %. Die relativen Standardabweichungen betragen $\leq 10 \%$ und sind somit unter Beachtung der komplexen Matrices als sehr gut anzusehen. Eine Matrixkalibrierung mit internem Standardzusatz bedeutet zunächst immer einen analytischen Mehraufwand, bietet jedoch auch Vorteile. So können neben Matrixeffekten auch Wechselwirkungen zwischen den Analyten und der Matrix, sowie Verluste bei dem SPE-Schritt erfasst und kompensiert werden. Eine spätere Umrechnung des Ergebnisses unter Einbeziehung der Wiederfindungsraten entfällt. In anderen Arbeiten wurden analog die relativen Wiederfindungen gegen eine Matrixkalibrierung mit internem Standardzusatz bestimmt (Carter et al., 2014; Huang et al., 2013; Martínez-Carballo et al., 2007; Shelver and Varel, 2012; Spielmeier et al., 2014) (**Tabelle C-2**). Diese sind vergleichbar mit den Wiederfindungen dieser Arbeit. Auf weitere kosten- und zeitintensive Probenaufreinigungsschritte konnte – aufgrund der niedrigen Bestimmungsgrenzen – somit verzichtet werden. Der Vergleich der Wiederfindungsraten mit anderen Literaturdaten erweist sich als schwierig, da häufig nicht angegeben wird, ob die Wiederfindungen in Bezug auf Lösungsmittel- oder Matrixkalibrierungen bestimmt wurden. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden absolute Wiederfindungen gegen Lösungsmittelkalibrierungen mit internem Standardzusatz für Rindergülle auf einem Dotierniveau von $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ bestimmt. Hierbei wurden Wiederfindungen zwischen 79 % und 168 % für Rindergülle erreicht (**Abbildung 4-9**, **Abbildung 4-10**). Spielmeier et al. bestimmten auf die gleiche Art Wiederfindungsraten in Gülle. Diese lagen im Bereich von 25 % – 120 % (Spielmeier et al., 2014). Auch für die Matrices Weidelgras und Möhrenrübe wurden die absoluten Wiederfindungen gegen einen Lösungsmittelstandard mit internem Standardzusatz bestimmt (**Tabelle C-1**). Die Ergebnisse zeigen, dass selbst mit internen Standards – sofern diese nicht die korrespondierenden $^{13}\text{C}_6$ -Analoge der Analyte darstellen – Lösungsmittelkalibrierungen oftmals nur unter Korrektur der Wiederfindungen für die Quantifizierung der Analyte in

matrixreichen Proben geeignet sind. Da $^{13}\text{C}_6$ -markierte Tetracycline bislang sehr teuer sind, werden diese häufig durch Demeclocyclin (diese Arbeit; Batt et al., 2007) oder geeignete $^{13}\text{C}_6$ -markierte Sulfonamide (Spielmeyer et al., 2014) ersetzt. Dies führt bei der Quantifizierung über Lösungsmittelkalibrierungen wiederum zu Unterschieden in den Wiederfindungen. Eine Vergleichbarkeit der Methoden wird somit erschwert. Um alle Matrixeinflüsse und Verluste über den Probenvorbereitungsschritt zu berücksichtigen und zu kompensieren wurde daher entschieden, für alle Matrices einheitlich eine Quantifizierung über Matrixkalibrierungen vorzunehmen. Da zu jedem Aufwuchs- und Lysimeterversuch Kontrollansätze mitgeführt wurden, stand ausreichend adäquates Blindwert-Matrixmaterial zur Verfügung.

Das entwickelte SPE-Protokoll konnte neben der Anreicherung der Probenextrakte aus der Fest-Flüssig-Extraktion von Gülle, Möhren und Weidelgras auch für die Analyse von Bodeneluatn gleichermaßen verwendet werden. Es ist zudem für die Automatisierung über ein Anreicherungsgerät sehr gut geeignet, wodurch mehrere Wasserproben parallel aufgearbeitet und größere Probenvolumina eingesetzt werden können. Für die Bestimmung von Tetracyclinen und Sulfonamiden in Bodeneluatn, konnten über den SPE-Aufarbeitungsschritt für alle Analyten Bestimmungsgrenzen von 1 ng L^{-1} erreicht werden. Die Probenvorbereitung (**Kapitel 3.11.2**) und die erhaltenen Bestimmungsgrenzen (**Tabelle 4-12**) sind vergleichbar mit anderen publizierten Methoden (Batt and Aga, 2005; Botitsi et al., 2007) (**Tabelle C-3**). Durch ein größeres Anreichervolumen ist eine weitere Absenkung der Bestimmungsgrenzen möglich (Zhang et al., 2015). Das Direktinjektionsverfahren konnte für die Analytik von Grundwasserproben auf Antibiotikarückstände ab einem Konzentrationsbereich von 50 ng L^{-1} angewandt werden und stellt somit eine schnelle und effiziente Methode für die Routineanalytik bzw. das Screening zahlreicher Wasserproben dar.

Da an dem UHPLC-MS/MS-Messgerät andere Routineuntersuchungen unter Verwendung von Acetonitril und Wasser mit jeweils 0,1 %igem Ameisensäurezusatz als Eluenten liefen, wurde auch die Messmethode für Antibiotika mit diesen Eluenten optimiert. In der Literatur sind überwiegend angesäuerte Acetonitril/Wasser-Gemische, als auch angesäuerte Wasser/Methanol-Gemische im Einsatz (Azanu et al., 2016). Die entwickelte Messmethode ist für die Routineanalytik sehr gut geeignet, da sie einen hohen Probendurchsatz in geringer Zeit ermöglicht (10 Minuten pro HPLC-Trennung). Ebenfalls ist die Messmethode für den Nachweis der Antibiotika in allen zehn Matrices anwendbar. Für die Trennung wurde eine Biphenyl-Säule verwendet. Über diese konnte eine gute Trennung zwischen (Epi)-CTC und (Epi)-iso-CTC erreicht werden. Epimere und Isomere unterscheiden sich im Hinblick auf ihre π -Elektronendichten im aromatischen Ringsystem. Durch die Verwendung einer Biphenyl-Säule können π - π -Interaktionen stattfinden, die eine Trennung ermöglichen (Kromidas, 2016). Die Säule hielt zudem mehr als 3.000 Injektionen stand, ohne die Peaktrennung und Peakformen negativ zu beeinflussen. Auch Azanu et al. verwendeten eine vergleichbare Säule für den Nachweis von Tetracyclinen in Karotten (Azanu et al., 2016). Weitere Methodenübersichten zum Nachweis von Antibiotika in Pflanzen, Gülle, Boden und Wasser sind in Artikeln von Wu et al., Thiele-Bruhn et al. und

Carvalho et al. zusammengestellt (Carvalho and Santos, 2016; Thiele-Bruhn, 2003; Wu et al., 2015).

Die entwickelten LC-MS/MS-Verfahren wurden im Anschluss an deren erfolgreiche Validierung (Kenndaten siehe **Kapitel 4.2**) für die Bestimmung von Antibiotikarückständen in Aufwuchsproben (Gülle, Boden, Gras, Möhren), Lysimeterproben (Bodeneluate, Boden, Gülle) und Grundwasserproben herangezogen. Die Diskussion der erhaltenen Ergebnisse hierzu folgt in den nachstehenden Kapiteln.

5.2 Antibiotikarückstände in Rindergülle der Aufwüchse und Lysimeter

5.2.1 Einfluss der Güllevorbehandlungen auf die Antibiotikakonzentration in der Gülle

Verschiedene Studien zeigten, dass die Lagerung von Gülle, als auch deren Fermentation und Kompostierung zu einer Reduzierung der Konzentrationen verschiedener Antibiotika-Wirkstoffe beitragen kann (Alvarez et al., 2010; Arikian et al., 2007; Dolliver et al., 2008; Mohring et al., 2009; Motoyama et al., 2011; Spielmeyer et al., 2015). Insbesondere der Fermentationsprozess in Biogasanlagen wird als potentielle Senke für Veterinärantibiotika gesehen und zunehmend untersucht (vgl. **Kapitel 1.5**). Abhängig von der Praxis der Güllebehandlung können Tierarzneimittel daher in unterschiedlichen Konzentrationen in die Umwelt gelangen (Fent, 2007).

Einfluss des anaeroben Fermentationsprozesses auf die Antibiotikakonzentration in der Gülle

Im Zuge der in dieser Arbeit durchgeführten anaeroben Güllefermentationen konnte für alle vier Wirkstoffe eine Konzentrationsabnahme beobachtet werden. Die Eliminierungsraten waren wirkstoffspezifisch und unterschieden sich zudem erheblich zwischen Substanzen derselben Wirkstoffgruppe. Während Sulfamethoxazol innerhalb der ersten Fermentationswoche vollständig eliminiert wurde bzw. unter den beschriebenen Extraktionsbedingungen nicht mehr nachweisbar war, konnten am letzten Fermentationstag noch 71 % – 74 % (Versuchsjahr 2014) und 40 % (Versuchsjahr 2015) des ursprünglich dotierten Sulfamethazins in den Fermentationsansätzen wiedergefunden werden (**Tabelle B-3, Tabelle B-8, Tabelle B-9**). Für das Versuchsjahr 2015 zeigte die graphische Auftragung des Sulfamethazinverlustes über die Zeit eine schnelle Abnahme von 100 mg kg⁻¹ (dotiert) auf ca. 40 mg kg⁻¹ in der ersten Fermentationswoche. Im weiteren Fermentationsverlauf war keine signifikante Abnahme mehr zu verzeichnen (**Abbildung 4-31**).

Die rasche Eliminierung des Sulfamethoxazols und die Persistenz des Sulfamethazins liegen im Rahmen dessen, was bereits in ähnlichen Studien beobachtet wurde. Mohring et al. untersuchten das Eliminierungsverhalten von sieben Sulfonamiden, darunter Sulfamethazin und Sulfamethoxazol, während eines fünfwöchigen Fermentationsprozesses. Sulfamethoxazol wurde innerhalb der ersten Fermentationswoche nahezu vollständig eliminiert. Sulfamethazin wies hingegen eine hohe Persistenz auf und konnte am 28. Fermentationstag noch zu 64 %, bezogen auf den an Tag Null bestimmten Gehalt, nachgewiesen werden (Mohring et al., 2009). Der

Wirkstoff Sulfamethoxazol wurde auch in anderen Studien als leicht eliminierbare Substanz beschrieben (Bailey et al., 2016; Carballa et al., 2007; Lin and Gan, 2011; Spielmeyer et al., 2017b; Zhang et al., 2013). Spielmeyer et al. bestimmten Halbwertszeiten von 0,5 – 0,8 Tagen, welche in Übereinstimmung zu der in dieser Arbeit ermittelten Halbwertszeit von 0,5 Tagen liegen (**Tabelle C-4**). Bailey et al. zeigten, dass eine komplette Eliminierung des Sulfamethoxazols innerhalb von 28 Tagen stattfindet. In einigen Experimenten konnten bereits Abbauprodukte des Sulfamethoxazols über Strukturaufklärung identifiziert werden (Alvarino et al., 2016; Spielmeyer et al., 2017b; Zhou and Moore, 1994). Selbst unter Einbeziehung identifizierter Abbauprodukte gibt es dennoch eine große Bilanzlücke. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der Bildung weiterer Abbauprodukte des Sulfamethoxazols liegen, die bislang nicht identifiziert werden konnten respektive wurden. Als Eliminierungsweg wird ein mikrobieller Abbau vermutet, da in autoklavierten Ansätzen eine verminderte Abbaurate zu verzeichnen war (Spielmeyer et al., 2017b; Zhang et al., 2013). Auch in Studien von Alvarino et al. wurden Biotransformationsprozesse als Haupteliminierungswege des Sulfamethoxazols deklariert, während Mineralisierungs- und Sorptionsprozessen ein vernachlässigbarer Einfluss (< 5 %) auf die Eliminierung zugesprochen wurde (Alvarino et al., 2016). Generell gibt es derzeit nur wenige Informationen über mögliche Abbauprodukte und deren antibiotischem Potential. Die Eliminierungswege (biotisch (mikrobielle Abbau- oder Transformationsprozesse); abiotisch (Temperatur, pH, Sorption, Sauerstoffgehalt)) bleiben zudem häufig ungeklärt und stellen eine interdisziplinäre wissenschaftliche Herausforderung dar. Für Sulfamethazin konnten Spielmeyer et al. nach 35-tägiger Fermentation bei 40 °C noch 80 % der Ursprungssubstanz, bezogen auf die detektierte Konzentration an Tag Null, nachweisen (Spielmeyer et al., 2017b). Diese Daten und die Daten von Mohring et al. decken sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit aus dem Versuchsjahr 2014. Nicht im Einklang hierzu stehen die nachgewiesenen, höheren Eliminierungsraten für Sulfamethazin während des anaeroben Fermentationsprozesses im Versuchsjahr 2015. Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung der Versuchsgülle der Jahre 2014 und 2015 könnten ein Grund für die divergierenden Eliminierungsraten des Sulfamethazins darstellen, wenn auch hier von einem biotischen Abbau ausgegangen wird. Untersuchungen in diesem Zusammenhang wurden in dieser Arbeit jedoch nicht vorgenommen. Des Weiteren zeigte der graphische Verlauf der Sulfamethazineliminierung über den 40-tägigen Fermentationsverlauf im Jahr 2015 große Schwankungen. Kahle und Stamm sprachen in diesem Zusammenhang von ablaufenden Sorptions- und Desorptionsprozessen zwischen dem Wirkstoff und Güllebestandteilen im Fermentationsansatz (Kahle and Stamm, 2007a). Auf der anderen Seite korrespondiert die starke Variation der Sulfamethazineliminierung in zwei getrennt voneinander durchgeführten Versuchen unter ähnlichen Versuchsbedingungen mit Ergebnissen anderer Autoren. Cessna et al. berichteten von ähnlichen Schwankungen nach einer Kompostierung unter aeroben Bedingungen (Cessna et al., 2011). Anhand zweier unabhängiger Versuchsansätze beobachteten die Autoren eine Sulfamethazineliminierung von rund 40 % innerhalb von 36 Tagen und eine Eliminierung von ca. 30 % innerhalb von 28 Tagen. Die Antibiotikaabnahme über die Zeit verlief in beiden Ansätzen so unterschiedlich, dass Halbwertszeiten von 27 und 237 Tagen berechnet wurden. Andere Studien führten zu einer Halbwertszeit von 7 Tagen (Böhm, 1996), welche

auch auf Grundlage der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse kalkuliert wurde. Auch die Probenahme kann zu Konzentrationsschwankungen beitragen. Die inhomogene Verteilung der Wirkstoffe im Reaktor, begründet durch den höheren Feststoffanteil der Gülle zu Beginn der Fermentation, könnte hier der ausschlaggebende Faktor für die Unterschiede zwischen den beiden Versuchsjahren darstellen. Durch die Inhomogenität der Gülle kann nicht vollständig vermieden werden, dass veränderliche Anteile von Fest- und Flüssigbestandteilen aus den Reaktoren entnommen werden. Studien von Bailey et al. zeigten, dass die höchsten Antibiotikakonzentrationen im flüssigen Teil der Gülle nachweisbar sind, mit Zunahme des Feststoffanteils jedoch abnehmen. Dies wurde auf Sorptionsprozesse zurückgeführt (Bailey et al., 2016). Eine repräsentative Probenahme wird bei dieser Matrix folglich erschwert.

Ferner unterlagen die beiden Tetracycline Chlortetracyclin und Doxycyclin unterschiedlich starken Eliminierungen während der anaeroben Fermentation (**Tabelle B-3**, **Tabelle B-8**, **Tabelle B-9**).

In Bezugnahme auf die dotierte Konzentration zu Beginn der Fermentation, wurde Chlortetracyclin zu 62 % – 78 % (Versuchsjahr 2014) und 85 % (Versuchsjahr 2015) eliminiert. Doxycyclin wies eine geringere Eliminierungsrate von 17 % – 23 % im ersten Versuchsjahr und 42 % im zweiten Versuchsjahr auf. Zu dem Verhalten von Tetracyclinen während der Kompostierung und Fermentation liegen ebenfalls verschiedene Literaturdaten vor. So konnte Chlortetracyclin nach einer 21-tägigen Kompostierung nicht mehr nachgewiesen werden (Selvam et al., 2012). Arikan et al. und Hu et al. berichten ebenfalls von Eliminierungsraten des Chlortetracyclins von ≥ 97 %. Zudem konnte ein Anstieg in der Eliminierung mit zunehmender Temperatur beobachten werden (Arikan et al., 2009b; Arikan et al., 2009a; Hu et al., 2011). Studien von Varel et al. beschäftigten sich ebenfalls mit der Abnahme der Chlortetracyclinkonzentration in Schweinegülle, welche in Bioreaktoren unter anaeroben Bedingungen bei 38 °C und 55 °C behandelt wurde. Hier konnten Eliminierungsraten von 80 % bzw. 90 % beobachtet werden (Varel et al., 2012). Auch in Studien von Spielmeyer et al. zeigte Chlortetracyclin eine bemerkenswerte Eliminierung (89 % bezogen auf die analysierte Konzentration an Tag Null) (Spielmeyer et al., 2017b). Wu et al. hingegen stellten für den gleichen Wirkstoff eine geringere Eliminierung von 74 % fest (Wu et al., 2011). Die erhobenen Daten dieser Arbeit in Bezug auf das Eliminierungsverhalten des Chlortetracyclins liegen folglich im Rahmen dessen, was in unabhängigen Studien auf internationaler Ebene berichtet wurde. Im Falle des Chlortetracyclins konnten bereits iso-Chlortetracyclin und dessen 4-Epimer als Haupttransformationsprodukte identifiziert werden (Arikan, 2008; Cessna et al., 2011; Spielmeyer et al., 2017b). Basierend auf diesem Wissen, wurde iso-Chlortetracyclin in die Messmethode der vorliegenden Arbeit implementiert. Einhergehend mit der Abnahme der (Epi)-Chlortetracyclinkonzentration konnte in beiden Versuchsjahren die Bildung des (Epi)-iso-Chlortetracyclins analytisch bestimmt werden (**Tabelle B-4**, **Tabelle B-8**, **Tabelle B-9**, **Abbildung 4-21**, **Abbildung 4-31**).

Die Bildung wird durch basische Bedingungen, wie sie in der Gülle vorherrschen, begünstigt (Halling-Sørensen et al., 2002). So konnte eine Temperatur- und pH-Wert-Abhängigkeit der Abbauprozesse gezeigt werden. Mit zunehmender Temperatur und Erhöhung des pH-Werts

kam es zu einer schnelleren Transformation (Loftin et al., 2005; Shelver and Varel, 2012). Dies konnte auch im Rahmen der Methodenentwicklung dieser Arbeit bestätigt werden (**Kapitel 4.1**). Im Gegensatz zur Epimerisierung ist die Isomerisierung irreversibel. Ferner hat die Bildung der Isoform möglicherweise einen positiven Einfluss auf die Umwelt, da die antimikrobielle Aktivität von iso-Chlortetracyclin und dessen Epimer im Vergleich zum Chlortetracyclin bis zu 99 % reduziert ist (Blackwood and English, 1970; Halling-Sørensen et al., 2002; Mitscher, 1978). Ähnlich wie in anderen Studien deckt die Bildung von (Epi)-iso-Chlortetracyclin nicht den kompletten Verlust des Chlortetracyclins ab. Als mögliche Ursachen hierfür wurden bereits weitere Eliminierungen des Chlortetracyclins zu anderen, noch nicht identifizierten Abbauprodukten oder weiterer Abbau des entstandenen iso-Chlortetracyclins und Sorptionsprozesse diskutiert (Arikan et al., 2009a; Spielmeyer et al., 2015). Die Bildung der Isoform und deren weitere Eliminierung könnten in dem vorliegenden Versuchsansatz parallel erfolgt sein. In **Abbildung 5-2** ist die Isomerisierung von Chlortetracyclin im alkalischen Milieu dargestellt. Neben der Temperaturabhängigkeit konnte zudem für den Wirkstoff Tetracyclin in Schweinegülle ein stärkerer Abbau unter aeroben Bedingungen im Vergleich zu anaeroben beobachtet werden (Kühne et al., 2000).

Im Gegenzug zu dem Eliminierungsverhalten von Sulfonamiden, konnten für Tetracycline keine Unterschiede in der Wirkstoffeliminierung bei der Verwendung von autoklaviertem und nicht-autoklaviertem Material festgestellt werden. Auch dies untermauert die bereits oben beschriebenen präferenziell ablaufenden abiotischen Prozesse.

Neben dem (Epi)-iso-Chlortetracyclin wurden auch die acetylierten Hauptmetabolite der beiden Sulfonamide im Zuge der Methodenentwicklung in die Messmethode aufgenommen. Diese werden während der Metabolisierung der Wirkstoffe im tierischen Organismus gebildet und sind somit erwartungsgemäß in der verwendeten Gülle, welche im Nachhinein mit den Wirkstoffen angereichert wurde, nicht nachzuweisen. Bei der Untersuchung von Pflanzen und Grundwasserproben spielen sie jedoch eine Rolle (**Kapitel 5.4** und **5.5**).

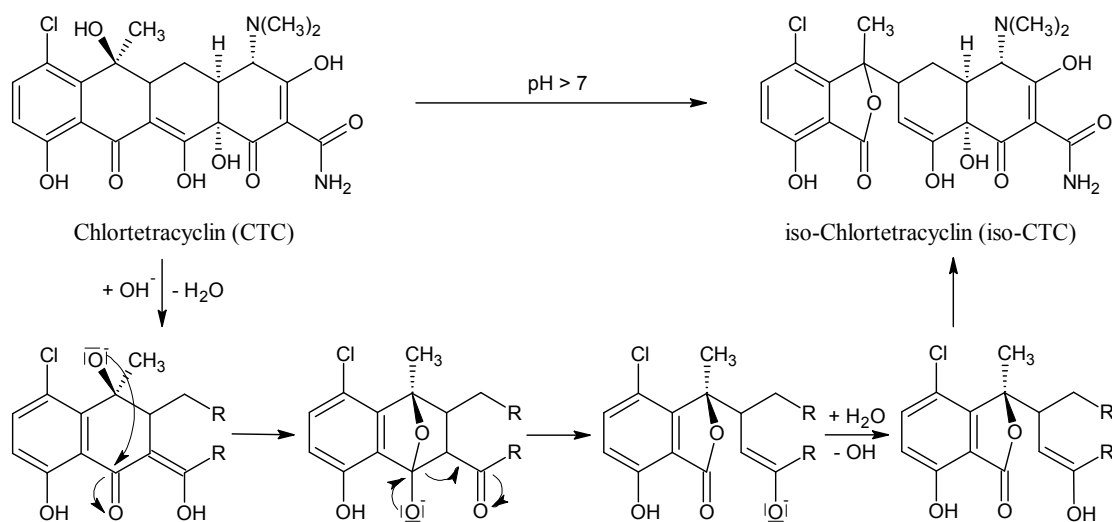


Abbildung 5-2: Isomerisierung des Chlortetracyclins unter alkalischen Bedingungen. Modifiziert nach (Bryan et al., 1992; Vockel, 2005).

Für Doxycyclin konnten Spielmeyer et al. nach 35-tägiger Fermentation bei 40 °C noch Wiederfindungsraten von mehr als 80 % ermitteln, wobei im Laufe des Fermentationsprozesses ein Abfall und später wieder ein leichter Anstieg der Doxycyclinkonzentration zu verzeichnen war (Spielmeyer et al., 2017b). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte durch die Auftragung der Doxycyclinkonzentration über die Fermentationsdauer nach einer anfänglichen Konzentrationsabnahme wieder ein kurzzeitiger Anstieg beobachtet werden. Dieser vergleichbare Trend in dem Eliminierungsverhalten zweier unabhängiger Testansätze suggeriert ähnlich ablaufende Eliminierungsprozesse. Ein möglicher Erklärungsansatz für dieses Phänomen könnte in dem Abbau von Feststoffen in der Gülle im Zuge des Fermentationsprozesses liegen, welcher zu einer zeitversetzten Freisetzung (Desorption) gebundener Rückstände beigetragen haben könnte. In der flüssigen Güllephase gelöst, sind sie für einen mikrobiellen Abbau zugänglich. Auch die Probenahme könnte, wie bereits für die Sulfamethazineliminierung beschrieben, zu gewissen Konzentrationsschwankungen führen. Aufgrund der Schwankungen war die Bestimmung der Halbwertszeit für Doxycyclin im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Weitere Untersuchungen zum Verhalten von Doxycyclin während einer 170-tägigen Lagerung von Schweinegülle unter anaeroben Bedingungen führten zu einer Gesamt-Wirkstoffeliminierung von 61 %. Die Autoren erklärten die Konzentrationsabnahme mit der Zeit durch Sorptionsprozesse des Wirkstoffes an Güllepartikel, welche zur Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände führten (Widyasari-Mehta et al., 2016b). Die beiden Gülleansätze für die Aufwuchsversuche dieser Arbeit wiesen ähnliche pH-Werte auf. Auch die Temperatur im Reaktionsansatz betrug beide Jahre 40 °C. Die Versuchsdauer unterschied sich jedoch (35 Tage und 40 Tage). Im Jahr 2015 wurde die Fermentation fünf Tage länger durchgeführt und führte zu höheren Eliminierungsraten beider Tetracycline. Dies untermauert den „Faktor Zeit“ als ausschlaggebende Größe zur Eliminierung der Tetracycline über Sorptionsprozesse. Generell werden Tetracycline hohe Sorptions- und Komplexbildereigenschaften zugesprochen. In der Literatur wird die Konzentrationsabnahme der Tetracycline in Wirtschaftsdüngern über die Bildung von Komplexen mit organischem Material, Huminsäuren, Proteinen und mehrwertigen Kationen (z.B. Calcium und Magnesium), welche in der Gülle vorliegen, erklärt (Aust et al., 2008; Bao et al., 2009; Chadwick and Chen, 2002; Kim et al., 2012; Loke et al., 2003; Loke et al., 2002; Martin, 1979). Dies führt zu einer Adsorption der Tetracycline und einhergehend damit sinkt deren Extrahierbarkeit (Kulshrestha et al., 2004). Obwohl die abiotischen Prozesse im Falle der Tetracycline als Hauptmechanismen für den Rückgang der Wirkstoffkonzentrationen angenommen werden, können auch biotische Prozesse (mikrobielle Aktivitäten) nicht ausgeschlossen werden. Diese Prozesse laufen vermutlich parallel ab. Durch Desorptionsprozesse könnte beispielsweise die Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe steigen, was diese gleichzeitig für einen mikrobiellen Angriff verfügbar macht. Auch die mikrobiologische Zusammensetzung, welche u.a. abhängig von der Fütterung der Tiere und dessen Alter ist, könnte in den beiden Versuchsjahren verschieden gewesen sein. Bislang sind die hierfür verantwortlichen mikrobiellen Prozesse nicht bekannt und es besteht umfassender Forschungsbedarf. Könnten Bakterien identifiziert werden, die zu einem Abbau von Arzneimitteln beitragen, so wäre ein Zusatz geeigneter Stämme bei der Güllenvorbehandlung sinnvoll (Kim et al., 2012).

Einfluss der aeroben Lagerung auf die Antibiotikakonzentration in der Gülle

Die aerobe Lagerung verlief lediglich über die Dauer von 8 Tagen bei 20 °C. Diese Bedingungen wurden nach Rücksprache mit allen Kooperationspartnern festgelegt. Während dieser Zeit unterlagen alle vier Antibiotika einer Konzentrationsabnahme. Für Sulfamethazin und Doxycyclin konnten Eliminierungsraten von jeweils 16 % bestimmt werden. (Epi)-Chlortetracyclin wies mit einer Wiederfindungsrate von 93 % die geringste Eliminierung auf. Sulfamethoxazol unterlag auch bei der Lagerung einer deutlichen Eliminierung von 92 % innerhalb von 8 Tagen. Die geringeren Eliminierungsraten aller Substanzen während der Lagerung, könnten auf die kürzere Vorbehandlungsdauer und die niedrigeren Temperaturen im Vergleich zu der Fermentation zurückzuführen sein. Des Weiteren stellt die Matrix Gülle ein sehr inhomogenes Gemisch aus festen und flüssigen Bestandteilen und einer diversen mikrobiologischen Zusammensetzung dar. Im Hinblick auf die mikrobiologische Zusammensetzung wurden keine Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Die Nährstoffanalyse durch die Mitarbeiter des Eichhofs in Bad Hersfeld ergab jedoch, dass gelagerte Gülle eine höhere Trockenmasse (9 %) aufweist als fermentierte Gülle (7 %) (**Tabelle 4-15**). Mit zunehmendem Trockenmassegehalt erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass die Substanzen an feste Bestandteile adsorbieren und somit für einen mikrobiologischen Abbau nicht zur Verfügung stehen (Schwarz, 2014; Wohde et al., 2016). Um einen direkten Vergleich zwischen anaerober Fermentation und aerober Lagerung vornehmen zu können, müssten die Versuchsbedingungen wie z. B. Temperatur und Zeit konstant gehalten werden. Bei der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Variablen geändert (Güllezusammensetzung, Temperatur, Sauerstoffzufuhr, Vorbehandlungsdauer), so dass keine konkreten Rückschlüsse auf die Auswirkungen der einzelnen Parameter in Bezug auf die Eliminierungsraten gezogen werden können, was auch nicht Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war. Hier ging es nicht primär um die Optimierung des Eliminierungsverhaltens der Wirkstoffe durch unterschiedliche GÜllebehandlungen, sondern vielmehr um die Gewährleistung praxisnaher Versuchsbedingungen und die Auswirkungen auf die Pflanzenaufnahme und das Versickern in das Grundwasser aufgrund der physikalisch-chemischen Unterschiede in Bezug auf z.B. Viskosität, Nährstoffzusammensetzung und pH-Wert der Gülle.

Vergleichbarkeit von Daten

Anhand der durchgeführten GÜlleuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine anaerobe Fermentation und eine aerobe Lagerung zu der Reduzierung von Antibiotikarückständen in der Gülle beitragen kann. Ein Vergleich der erhobenen Daten dieser Arbeit miteinander und mit Literaturwerten erwies sich aufgrund der unterschiedlichen Versuchsbedingungen als schwierig, da die Eliminierungsraten maßgeblich durch diese bestimmt werden. Faktoren wie die Matrixbeschaffenheit (z.B. mikrobiologische Zusammensetzung, pH-Wert, Trockenmassegehalt, Kationengehalt), Umwelteinflüsse und Vorbehandlungsbedingungen (z.B. Temperatur, aerobe oder anaerobe Bedingungen, Lichteinwirkung (Photodegradation)), sowie die Dauer der GÜllebehandlung nehmen einen Einfluss auf Transformations-, Abbau- und Sorptionsprozesse.

Für Optimierungsversuche auf diesem Themengebiet sind diese Faktoren demnach zu berücksichtigen. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann jedoch gefolgert werden, dass hohe Temperaturen, aerobe Bedingungen, lange Güllevorbehandlungszeiten und ein hoher Trockenmassegehalt der Gülle eine Antibiotika-Eliminierung begünstigen. Die verschiedenen Einflussfaktoren auf die Eliminierung der Wirkstoffe verdeutlichen die Wichtigkeit der Bestimmung der Antibiotikakonzentration in der Gülle direkt vor deren Ausbringung auf die Felder. Anhand dieser Daten können Transferraten der Antibiotika aus dem Gülle-Boden-Gemisch in die Pflanzen (Aufwuchsversuche) und in das Grundwasser (Lysimeterversuche) berechnet werden.

Auch die Halbwertszeiten während der Güllevorbehandlung sind schwer zu vergleichen (**Tabelle C-4**), da in der Literatur meist trotz erheblicher Schwankungen der Messwerte eine Kinetik erster Ordnung der Berechnung zugrunde gelegt wurde.

5.3 Antibiotikarückstände in den Versuchsböden

5.3.1 Antibiotikarückstände in unterschiedlichen Bodentiefen der Lysimeterrohre

Anhand der Analyse der Bodenproben können Aussagen über die Verlagerung der Wirkstoffe in Richtung Grundwasser getroffen werden. Zudem lassen sich Rückschlüsse auf das Persistenzverhalten der vier im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Wirkstoffe im Boden abschätzen. Der Transport von Wirkstoffen, sowie deren Persistenz wird von vielen Faktoren beeinflusst. Hierzu zählen u.a. die Löslichkeit und die Dissoziationseigenschaften der Wirkstoffe; die Struktur, der pH-Wert, der organische Kohlenstoffgehalt und die Kationenaustauschkapazität des Bodens; und klimatische Bedingungen wie Temperatur, sowie Menge und Intensität von Regenfällen.

Für die Lysimeterstudie und den Weidelgrasaufwuchs wurden zwei unterschiedliche Bodentypen gewählt, Volkmarser Sandboden und Baunataler Lössboden. Die charakteristischen Bodenparameter sind der **Tabelle 3-11** zu entnehmen. Der Lysimeterversuch wurde über einen Zeitraum von 32 Monaten gemäß den Ausführungen in **Kapitel 3.7** durchgeführt. Im Rahmen der Bodenanalyse (**Tabelle B-12**, **Abbildung 5-9**) konnten die beiden Tetracycline (Epi)-Doxycyclin und (Epi)-Chlortetracyclin lediglich in den oberen 5 cm der Lysimeterböden nachgewiesen werden. Auch das Transformationsprodukt (Epi)-iso-Chlortetracyclin, welches im Zuge der Güllevorbehandlung entstand, zeigte eine Persistenz im Oberboden und konnte nicht in tiefere Bodenschichten ausgewaschen werden. Sulfamethazin wies ebenfalls in den ersten 5 cm der beiden Versuchsböden den höchsten Gehalt auf, war jedoch im Sandboden noch bis in 15 cm Tiefe quantifizierbar. Im Lössboden (> 5 cm) und in tieferen Schichten des Sandbodens (> 15 cm) waren lediglich Spurenkonzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze zu beobachten. Die Konzentration nahm mit der Bodentiefe ab. Sulfamethoxazol konnte in keiner Bodenprobe nachgewiesen werden. Dies kann durch den Abbau dieser Substanz während des Fermentationsprozesses begründet werden (**Tabelle B-3**). Die erhaltenen Ergebnisse stehen im Einklang mit Literaturdaten. Tetracycline sind Wirkstoffe mit hohen K_d -Werten (290 – 1.620). Sie gelten als immobile Substanzen, welche stark an Bodenpartikel binden (Burkhardt and

Stamm, 2007; Rabølle and Spliid, 2000) und zudem ein hohes Persistenzverhalten in der Ackerkrume (0 – 30 cm) zeigen (De Liguoro et al., 2003; Hamscher et al., 2005a; Hamscher et al., 2002; Hamscher et al., 2000; Höper et al., 2002). Sulfonamide hingegen werden aufgrund ihres geringen Sorptionskoeffizienten (0,6 – 4,9) als mobile Wirkstoffe angesehen, die in tiefere Bodenschichten verlagert werden können (Blackwell et al., 2007). Sie besitzen das Potential bis ins Grundwasser vorzudringen (Hembrock-Heger et al., 2011; Tolls, 2001). Auch Davis et al. bestätigten durch ihre Untersuchungen die gute Infiltration des Sulfamethazins mit dem Regenwasser (Davis et al., 2006). Durch das Auffinden von Sulfonamiden in Grundwasserproben des Routinemessprogrammes im Auftrag des HLNUG, in Bodeneluatn der Lysimeterstudien und in den Aufwüchsen, gemäß den Ergebnissen dieser Arbeit (**Kapitel 4**), wird diese Einschätzung untermauert.

Tabelle C-5 fasst Literaturdaten nachgewiesener Tetracyclin- und Sulfonamid-Konzentrationen in unterschiedlichen Bodenschichten zusammen. Auch hier ist mit der Zunahme der Bodentiefe eine Abnahme der Wirkstoffkonzentrationen zu verzeichnen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit. In der Literatur sind Rückstandsnachweise an Tetracyclinen häufig bis in 30 cm Bodentiefe zu finden. In der landwirtschaftlichen Praxis gibt es verschiedene Techniken der Gülleausbringung (Breitverteiler, Schleppschläuche, Schleppschuhtechnik, Schlitzverfahren). Das Unterpflügen der oberflächlich aufgetragenen Gülle ist zur Vermeidung von Geruchsbelästigungen und Nährstoffverlusten in der Düngeverordnung vorgeschrieben (DüV, 2017). Auch der Antibiotikaeintrag erfolgt somit bis in den Pflughorizont (0 – 30 cm). Die meisten in der Literatur untersuchten Böden stammen von Ackerflächen, die gemäß der landwirtschaftlichen Praxis eine Gülledüngung in höheren Frequenzen und mit Unterpflügen erhielten. Bei den Lysimeterstudien wurde die Gülle rein oberflächlich auf den Boden aufgebracht, ohne anschließende Einarbeitung. In Folge dessen sind die höchsten Konzentrationen an Antibiotikarückständen vermutlich in der obersten Bodenschicht (0 – 5 cm) der Lysimeter aufzufinden. Aufgrund der verschiedenen Gülleausbringungstechniken und der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen der Gülle, sowie der unbekanntenen Zeitspanne zwischen Gülleausbringung und Probenahme, ist ein Datenvergleich mit anderen Studien schwierig. Das persistente Verhalten aller über die Gülle in den Lysimeterboden eingetragenen Wirkstoffe, konnte in dieser Studie jedoch über einen Beobachtungszeitraum von > 32 Monaten durch deren Nachweis im Oberboden belegt werden.

Das unterschiedliche Infiltrationsverhalten des mobileren Sulfamethazins in Sand- und Lössböden, ist durch die unterschiedlichen Bodeneigenschaften zu erklären. Die Morphologie der festen Bodenbestandteile, das Bodengefüge, ist bei diesen beiden Bodenarten verschieden. Durch das Bodengefüge wird der Wasser- und Lufthaushalt, die Durchwurzelbarkeit und die Verfügbarkeit von Nährstoffen beeinflusst. Der verwendete Sandboden „Volkmarser Sand“ besteht aus Sand (72,9 %), Schluff (19,1 %) und Ton (8 %), während der verwendete Lössboden „Bau-nataler Löss“ hauptsächlich aus Schluff besteht (Sand: 3,3 %, Schluff: 76,4 %, Ton: 20,3 %). Die Korngrößen dieser Sedimente unterscheiden sich und haben Einfluss auf die Bodeneigenschaften:

- Sand: 2,0 bis 0,063 mm
- Schluff: 0,063 bis 0,002 mm
- Ton: < 0,002 mm.

Sandböden werden als Einzelkorngefüge beschrieben, bei welchem die Bodenteilchen lose nebeneinander vorliegen. Sie zeigen ein geringes Porenvolumen, aber viele Grobporen ($> 50 \mu\text{m}$). Dies führt zu einer verringerten Wasserspeicherkapazität. Als Folge der geringen Sorptionsneigung werden insbesondere mobile Substanzen mit dem Sickerwasser bis in tiefere Schichten ausgewaschen. Lößböden zeigen ein Kohärentgefüge, die Bodenteilchen sind miteinander verklebt und es resultiert ein hohes Wasserspeichervermögen (Scheffer et al., 2010). Ein verlangsamtes Einsickern der Antibiotika in tiefere Bodenschichten ist die Folge (vgl. **Kapitel 5.3.2**). Des Weiteren nimmt die Korngröße einen entscheidenden Einfluss auf die spezifische Oberfläche des Bodens durch die Generierung verfügbarer Bindungsstellen. Diese beträgt bei der Sandfraktion weniger als $0,1 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Die Schlufffraktion besitzt hingegen $0,1$ bis $1 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ und die Tonfraktion 5 bis $500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ spezifische Oberfläche (Scheffer et al., 2010).

Nachdem in diesem Kapitel die Auswirkungen der Textur und Bewirtschaftung des Bodens auf die Verlagerung der Substanzen herausgestellt wurde, wird im folgenden Kapitel anhand der Aufwuchsböden näher auf die chemischen Bindungsmechanismen zwischen den Wirkstoffen und den verwendeten Versuchsböden eingegangen. Abiotische und biotische Faktoren werden diskutiert, die einen Einfluss auf das Eliminierungs- und Abbauverhalten der Wirkstoffe im Boden nehmen können. Zudem wird das Antibiotikarückstandsverhalten im Boden in Bezug auf die unterschiedlichen Gülleeigenschaften (gelagert und fermentiert) diskutiert.

5.3.2 Antibiotikarückstände in Böden der Aufwuchsstudien nach der Ernte

Bei dem Weidelgrasaufwuchs in Mitscherlichgefäßen wurde der Versuchsboden nach der Ernte der Pflanzen vom Personal des LLHs händisch durchmischt und eine Teilprobe zur Analyse an den LHL gesendet. Durch Bezugnahme der analysierten Bodengehalte auf den ursprünglich über Gülle eingetragenen Wirkstoffgehalt, konnten noch ca. 10 % der Tetracycline und ca. 4 % des Sulfamethazins in den Volkmarser Sandböden nach dem viermonatigen Aufwuchs nachgewiesen werden. Bei dem Baunataler Löß konnten 4 Monate nach der Begüllung ca. 5 % der Tetracycline und ca. 2 % des Sulfamethazins wiedergefunden werden. Sulfamethoxazol war aufgrund der vorangegangenen Eliminierung im Zuge der Güllefermentation nicht nachweisbar.

Unterschiede im Rückstandsverhalten von Tetracyclinen und Sulfonamiden

Die geringeren Konzentrationsrückstände von Sulfamethazin im Boden, verglichen mit der Konzentration an Doxycyclin und Chlortetracyclin, lassen sich mit einem geringeren Sorptionskoeffizienten erklären (**Tabelle 1-2**). Eine geringe Sorptionsneigung korreliert mit einer erhöhten Mobilität und Auswaschung (Leaching und Run-off-Prozesse), was durch den Nachweis des Sulfamethazins in allen Bodenschichten und in den Bodeneluat (detaillierte Betrachtung

erfolgt in **Kapitel 5.5**) bestätigt wurde. Weiterhin weisen mobile Substanzen in der Regel eine gute Bioverfügbarkeit auf. Durch die bessere Bioverfügbarkeit der Sulfonamide, könnten diese auch einem biotischen Abbau oder Transformationsprozessen durch Mikroorganismen im Boden unterliegen. Yang et al. konnten in Schlammproben bereits einen Abbau von Sulfonamiden durch die Bakterien *Acinetobacter* und *Pseudomonas* feststellen (Yang et al., 2016). Aktuelle Studien aus China stellten einen schnelleren Abbau von Sulfamethoxazol in nicht-sterilen Böden (DT50¹⁶: 29 – 36 Tage) im Vergleich zu sterilen Böden (DT50: 36 – 50 Tage) heraus, was zudem einen mikrobiellen Abbau impliziert (Shen et al., 2018). Neben dem Vorhandensein spezieller Bakterien, können auch die Temperatur und der pH-Wert des Bodens einen Einfluss auf den Abbau nehmen (Savric, 2001). Auch eine Pflanzenaufnahme führt zu Konzentrationsabnahmen im Boden (**Kapitel 5.4**) (Jechalke et al., 2014). Alle aufgeführten Faktoren resultieren in einer Abnahme der extrahierbaren Antibiotikakonzentration im Boden (**Abbildung 5-3**), wie in dieser Arbeit analytisch bestätigt wurde.

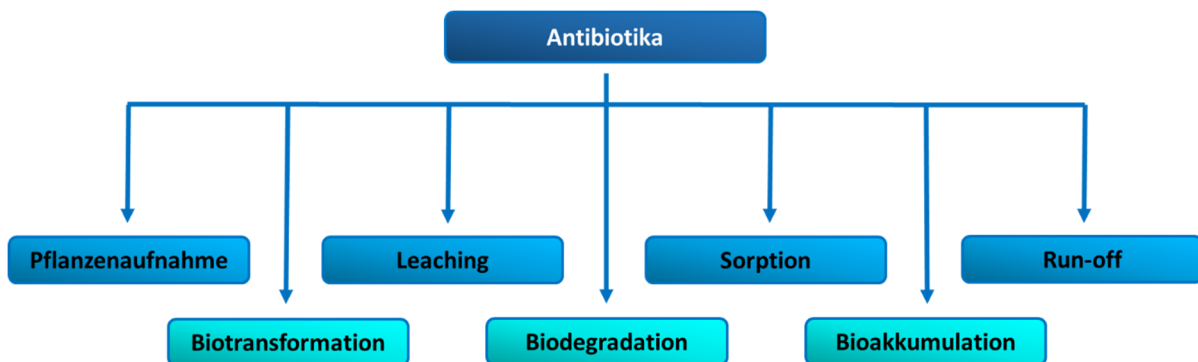


Abbildung 5-3: Mögliche Transportwege für Antibiotika in Böden. Modifiziert nach (Hashmi et al., 2017).

Rückstandsverhalten von Tetracyclinen und Sulfonamiden in verschiedenen Bodentypen

Literaturdaten zeigen, dass die Persistenz und Akkumulation von Wirkstoffen je nach Bodentyp stark variiert (vgl. **Tabelle C-5**). Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Im Vergleich zum Volkmarser Sandboden waren die detektierten Restgehalte an Antibiotika im Baunataler Lössboden um den Faktor zwei geringer. Eine stärkere Adsorption der Antibiotika an Partikel des Lössbodens könnte für die geringeren Wiederfindungen verantwortlich sein. Andere Studien beschrieben ebenfalls einen solchen Zusammenhang. So stellten Accinelli et al. bei dem Vergleich des Verhaltens von Sulfamethazin in Lehm- und Sandboden, in Anlehnung an die Ergebnisse dieser Arbeit, ein schnelleres Eliminierungsverhalten der Substanz im Lehm Boden fest. Sie bestimmten Halbwertszeiten von 18,6 Tagen (Lehm Boden) und 21,3 Tagen (Sandboden) (Accinelli et al., 2007).

¹⁶ DT50: Abnahme der Ausgangskonzentration um die Hälfte (Halbwertszeit).

Die verwendeten Versuchsböden besitzen vergleichbare pH-Werte (~ 7), weisen jedoch Unterschiede in dem Gehalt an organischem Kohlenstoff, dem Gehalt an Kationen und dem Gehalt an Ton auf (**Tabelle 3-11**). Der organische Kohlenstoffgehalt des Lössbodens liegt mit 0,88 % geringfügig über dem des Sandbodens mit 0,55 %. Der Gehalt an mehrwertigen Kationen ist hingegen im Lössboden deutlich höher. Der Magnesiumgehalt liegt hier beispielsweise bei 20 %, verglichen mit nur 3 % Magnesium im Sandboden. Des Weiteren weist der Lössboden einen Tonanteil von 20,3 % auf, während dieser im Sandboden nur 8 % beträgt.

Tonminerale und Kationengehalt

In Studien wurde die Adsorption von Sulfonamiden und Tetracyclinen an Tonminerale im Zusammenhang mit dem pH-Wert, der Ionenstärke und der Kationenaustauschkapazität untersucht (Gao and Pedersen, 2005; Sithole and Guy, 1987; Srinivasan et al., 2013). Hierbei konnten die Autoren zeigen, dass Sulfonamide im sauren Milieu stark an Tonminerale binden, während im basischen Milieu die Bindungsaffinität, aufgrund repulsiver Wechselwirkungen zwischen der Anionenform und der negativ geladenen Bodenoberfläche abnimmt. Ebenfalls konnten ter Laak et al. für die Beeinflussung des K_d -Wertes von Tetracyclinen und Sulfonamiden an Böden mit der Zunahme des Boden pH-Wertes eine Abnahme des K_d -Wertes und somit der Bindungsaffinität bestätigen (ter Laak et al., 2006). Dies begründeten die Autoren über das Dissoziationsverhalten der Substanzen. Positiv geladene Antibiotika binden durch elektrostatische Anziehung an negativ geladene Tonminerale, an negativ geladene organische Bodensubstanz (z.B. Huminstoffe) oder sind an Kationenaustauschprozessen über Metallionen der Tonminerale beteiligt (Gao and Pedersen, 2005).

Die Nährstoffanalyse der verwendeten Versuchsböden dieser Arbeit lässt die Schlussfolgerung zu, dass Kationenaustauschprozesse mit Metallionen der Tonminerale insbesondere in dem Lössboden von Bedeutung sind. Der Gehalt an Ton und Magnesium ist in dem Lössboden höher als in dem Sandboden und könnte so die stärkere Adsorption der Wirkstoffe an den Lössboden begründen. Die pH-Werte der in dieser Arbeit verwendeten Versuchsböden liegen im neutralen Bereich. Sulfamethazin besitzt einen pK_a -Wert im Bereich des Boden-pHs und liegt zum größten Teil in der neutralen und zu einem geringen Teil in der anionischen Form vor. Für diesen Wirkstoff werden folglich Kationenaustauschprozesse eine untergeordnete Rolle spielen. Die Tetracycline liegen unter den gewählten Versuchsbedingungen hauptsächlich in ihrer zwitterionischen Form vor. Kationenaustauschprozesse unter Beteiligung der protonierten Dimethylammonium-Gruppe sind somit denkbar. Auch die Ladungszahl der Kationen kann die Stärke der Adsorption beeinflussen. Sithole und Guy beobachteten beispielsweise für Oxytetracyclin eine 2,5fach stärkere Adsorption, wenn Ca^{2+} statt Na^+ an Tonminerale adsorbierte (Sithole and Guy, 1987; Thiele-Bruhn, 2003). Die Wirkstoffe neigen zudem zur Bildung reversibler Komplexe mit mehrwertigen Kationen, welche in der Bodenlösung vorliegen (Kemper, 2008; Thiele-Bruhn, 2003; Wessels et al., 1998). In **Abbildung 5-4** ist die Komplexbildung zwischen

Tetracyclinen und Magnesiumionen beispielhaft aufgeführt. Die Ionenstärke des Mediums beeinflusst diese Komplexbildung.

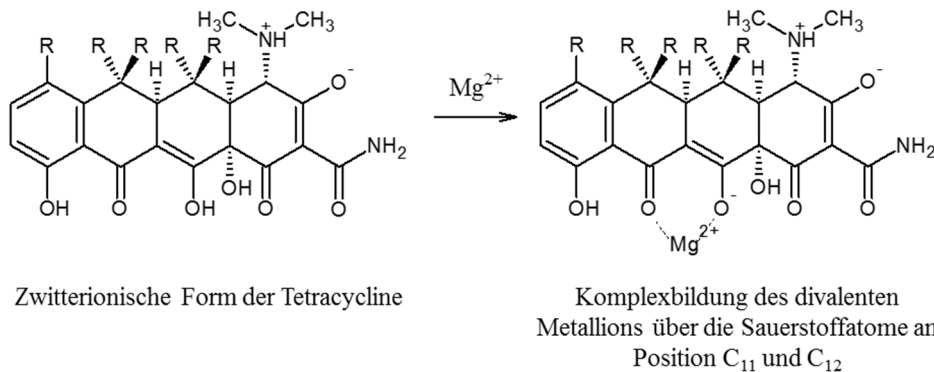


Abbildung 5-4: Komplexbildung zwischen Tetracyclinen und Magnesiumionen.

Die geringeren Rückstandskonzentrationen im Lößboden können damit erklärt werden, dass die Substanzen aufgrund der stärkeren Bindungsaffinität nicht vollständig extrahiert werden konnten. Diese Aussage wird zusätzlich durch in der Literatur beschriebene K_d -Werte unterstützt. Die Sorptionskoeffizienten, welche anhand von Literaturdaten zusammengefasst werden konnten (**Tabelle 1-2**), zeigen höhere Werte für Böden mit einem höheren Anteil an Ton. Ein höherer Tongehalt sorgt aufgrund der geringeren Korngröße zudem für eine größere spezifische Oberfläche (Scheffer et al., 2010). Daraus resultiert eine größere Anzahl verfügbarer Bindungsstellen. Für die größtenteils neutral vorliegenden Sulfonamide spielt die Bindung an organische Bodensubstanz vermutlich eine bedeutendere Rolle.

Organische Bodensubstanz (SOM: Soil Organic Matter)

Organische Stoffe im Boden besitzen überwiegend negative Ladungen und funktionelle Gruppen (z.B. Carboxylgruppen). Über diese können sowohl Sulfonamide als auch Tetracycline binden (Thiele-Bruhn et al., 2004). Über die Bindungsmechanismen an organische Bodenbestandteile liegen noch viele Unklarheiten vor (Figueroa-Diva et al., 2010). In der Literatur werden schwache Bindungen wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Wechselwirkungen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen als auch starke Bindungen wie kovalente Bindungsformen angenommen (Chu et al., 2013; Gao and Pedersen, 2010; Schwarz et al., 2012; Srinivasan et al., 2013). Kovalente Bindungen führen dazu, dass der Wirkstoff nicht mehr extrahierbar ist, man spricht von nicht-extrahierbaren Rückständen (**NER: Non Extractable Residues**; gebundene Rückstände) (Heise et al., 2006).¹⁷ Die Adsorption von Antibiotika an SOM ist stark und hängt von deren Menge und der Zusammensetzung ab (Thiele, 2000). Die Zunahme des

¹⁷ Bedeutung/Verwendung des Begriffes „nicht-extrahierbare Rückstände“ (**NER: Non Extractable Residues**):

1. Kovalente Bindungen führen dazu, dass der Wirkstoff auch unter drastischeren Bedingungen nicht mehr extrahierbar ist.
2. Aufgrund starker Sorption oder auch Sequestrierung können Wirkstoffe mit der eingesetzten Methode nicht freigesetzt werden.

organischen Kohlenstoffanteils und des Tonmineralgehaltes im Boden korreliert mit einer Zunahme an SOM. Die spezifische Oberfläche vergrößert sich und hat eine stärkere Adsorption der Wirkstoffe zur Folge (Chu et al., 2013; Scheffer et al., 2010) wodurch es zudem zu Sequestrierung kommen kann (Förster et al., 2009; Zarfl et al., 2009). Die spezifische Oberfläche von Huminstoffen beträgt beispielsweise $800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ bis $1.200 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Ferner beeinflusst die Feuchtigkeit des Bodens die Eigenschaften des SOM und damit verbunden auch die Sorptionseigenschaften der Antibiotika im Boden. So erhöht ein höherer Feuchtigkeitsgehalt die Zugänglichkeit für Bindungsstellen (Rosendahl et al., 2011). Entsprechend den Ausführungen von Rosendahl et al. müsste die Sorptionsaffinität der Antibiotika im feuchteren Lössboden erhöht sein, was sich anhand der Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt.

Die Vermutung liegt nahe, dass die angewandte Extraktionsmethode (**Kapitel 3.10.4.2**; Mischung aus McIlvaine-Puffer pH 6 und Methanol bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ im Ultraschallbad) den Teil der NER nicht (kovalent gebundener Wirkstoffanteil) bzw. nicht vollständig (durch starke Sorption oder Sequestrierung gebundener Wirkstoffanteil) in Lösung bringt und daher die nachgewiesenen Rückstandskonzentrationen im Lössboden geringer ausfielen als im Sandboden. Der real im Boden enthaltene Gehalt wird höher eingeschätzt. Es existieren einige Arbeiten, welche über sequentielle Extraktionen unter deutlich drastischeren Extraktionsbedingungen (z.B. Mikrowellenaufschluss; Temperaturen bis $200 \text{ }^\circ\text{C}$ unter Druck; Nachextraktion mit salzsaurem Methanol (Kreuzig et al., 2005) einen Großteil der Wirkstoffe selbst nach längerer Verweilzeit aus dem Boden extrahieren konnten (Jacobsen et al., 2004; Stoob et al., 2006). Methoden unter solchen Bedingungen sind insbesondere für die thermolabilen Tetracycline nicht geeignet. Kühne et al. konnten die Bildung der Anhydrotetracycline bei hohen Temperaturen (bis $133 \text{ }^\circ\text{C}$) nachweisen (Kühne et al., 2001). Für die vorliegende Arbeit sind primär die bioverfügbaren Wirkstoffrückstände, welche auch mit den mildereren Extraktionsbedingungen dieser Arbeit erfassbar sind (Sattelberger et al., 2005), relevant. Primär diese extrahierbaren Rückstände können in Pflanzen aufgenommen werden bzw. bis in das Grundwasser infiltrieren.

Gelöste organische Bodensubstanz

Durch die Einarbeitung der leicht basischen Gülle wird neben der pH-Wert-Beeinflussung auch der Gehalt an gelöster organischer Substanz (**DOM: Dissolved Organic Matter**) erhöht. Einige Studien beschreiben, dass hierdurch die Transporteigenschaften organischer Substanzen im Boden erhöht werden können (Chu et al., 2013; Kulshrestha et al., 2004; Seol and Lee, 2000; Zhang et al., 2012). Genauere Ausführungen zu DOM folgen in **Kapitel 5.5**. Bindungen an DOM spielen für die Verfrachtung stark sorbierender Wirkstoffe im Boden, wie beispielsweise der Tetracycline, eine Rolle.

Einwirkzeit und Abbau

Unabhängig von der Art des Bodens lagen die nachgewiesenen Antibiotikarückstände deutlich unter den Konzentrationen die ursprünglich über die Gülledüngung zugeführt wurden. Dies bestätigten ferner verschiedene Studien auf internationaler Ebene. Ein Grund hierfür wird in den vorab beschriebenen Sorptionseigenschaften der Substanzen gesehen. Die Sorption kann mit zunehmender Wechselwirkungszeit mit der umgebenden Matrix steigen und so die Bildung gebundener Rückstände und Sequestrierung begünstigen (Bailey et al., 2016). Da die Zeitspanne zwischen der letzten Gülleaufgabe und der Probenahme mit den nachgewiesenen Antibiotikarückständen korreliert, muss dieser Faktor bei dem Vergleich mit Literaturdaten beachtet werden. Bei den Aufwuchsversuchen dieser Arbeit lagen 120 Tage zwischen der Gülleaufgabe und der Bodenprobenahme. Bailey et al. zeigten für Sulfamethazin, Sulfamethoxazol und Tetracyclin eine Zunahme des K_d -Wertes mit der Inkubationszeit. Dieses Verhalten beobachteten die Autoren sowohl für Sandboden als auch für Lössboden.

Blackwell et al. konnten $< 10\%$ der ursprünglichen Konzentration an Oxytetracyclin und Sulfachloropyridazin in Sandboden mit einem geringen Anteil an Schluff und Ton 127 Tage nach der Bodenbehandlung nachweisen (Blackwell et al., 2007). Stevens wies 11 % der ursprünglichen Konzentration ein Jahr nach der letzten Gülleaufgabe im Boden nach (Stevens, 2009). Die Ergebnisse aus der Literatur stimmen mit den Werten dieser Arbeit überein. Wie bereits zuvor erläutert, spielen Sorptions- und Auswaschungsprozesse (Bewässerungsmenge) eine wichtige Rolle. Darüber hinaus können auch Mechanismen wie (a)biotischer Abbau und Transformationsreaktionen für den Konzentrationsrückgang der Substanzen im Boden verantwortlich sein. In diesem Zuge kann es ferner zur Bildung biologisch aktiver bzw. inaktiver Transformationsprodukte kommen. Abiotische Transformationsprozesse, die im Boden auftreten, umfassen Photolyse, Hydrolyse und Redoxreaktionen. Die direkte Photolyse von Antibiotika wird aufgrund der Einarbeitungstiefe der wirkstoffhaltigen Gülle in den Versuchsboden als unwahrscheinlich angesehen, da photolytische Abbauprozesse nur in den oberen 0,5 mm des Bodens zu erwarten sind (Hashmi et al., 2017; Hebert and Miller, 1990; Thiele-Bruhn and Peters, 2007). Die Oxidation der Antibiotika durch reaktive Oxidantien in der Tonfraktion, wie beispielsweise Manganoxide, kann hingegen als wahrscheinlicher betrachtet werden. Beide Versuchsböden enthalten Mangan (**Tabelle 3-11**). Literaturdaten zeigen, dass durch Manganoxide Oxytetracyclin und Sulfamethazin umgesetzt werden (Gao et al., 2012; Rubert and Pedersen, 2006; Zhang et al., 2008).

Auswirkung unterschiedlicher Gülleeigenschaften

Die Möhren wurden auf Volkmarser Sandboden kultiviert. Der Antibiotikaeintrag erfolgte hierbei durch die Einarbeitung von gelagerter und fermentierter Rindergülle. Die Rückstandgehalte in Böden mit fermentierter Gülle betragen ca. 9 % für die beiden Tetracycline und 4 % für Sulfamethazin und deckten sich somit mit den ermittelten Rückstandsgehalten des Vorjahres. In Ansätzen mit gelagerter Gülle betragen die Rückstandsgehalte an Chlortetracyclin,

Doxycyclin, Sulfamethoxazol und Sulfamethazin im Boden nach der Ernte 1,2 %, 2,7 %, 0,8 % und 2,5 %, bezogen auf den ursprünglich eingetragenen Antibiotikagehalt.

In der Literatur existieren verschiedene Erklärungsansätze für die geringen Wiederfindungen. Zum einen konnte für Sulfachloropyridazin eine Abnahme des K_d -Wertes bei steigendem Güllegehalt im Boden festgestellt werden (Boxall et al., 2002). Hieraus könnte eine höhere Auswaschungsgefahr resultieren. Die Erklärung wurde über eine pH-Wert-Verschiebung in den basischen Bereich und der Ausbildung der Anionenform der Wirkstoffe begründet. Repulsive Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Bodenoberfläche wurden als Gründe für die geringere Sorptionsneigung diskutiert. Auch für andere Sulfonamide konnte ein solches Verhalten beobachtet werden (Thiele-Bruhn and Aust, 2004). Da gelagerte Gülle einen etwas höheren pH-Wert aufwies als fermentierte Gülle (**Tabelle 4-15**), könnte dies die niedrigeren Wiederfindungen in Ansätzen mit gelagerter Gülle begründen. Auf der anderen Seite kann die Einarbeitung von Gülle zu einer Erhöhung organischer Bestandteile und Kationen im Boden beitragen. Durch die unterschiedlichen Vorbehandlungen besaß die verwendete Rindergülle dieser Arbeit unterschiedliche Trockenmassen. Fermentierte Gülle wies eine Trockenmasse von 7,1 % auf, während gelagerte Gülle 9,5 % Trockenmasse besaß. Aufgrund des geringeren Feststoffanteils konnte fermentierte Gülle den Boden vermutlich besser durchdringen und die Wirkstoffe wurden im Boden verteilt. Auf der anderen Seite bietet gelagerte Gülle, bedingt durch den höheren Feststoffanteil, eine größere Anzahl möglicher Bindungsstellen für Antibiotika. Auch der Gehalt an Kationen war in der gelagerten Gülle höher als in der fermentierten Gülle (**Tabelle 4-15**). Die stärkere Bindung der Substanzen in Ansätzen mit gelagerter Gülle könnte, wie bereits oben beschrieben, zu einer Abnahme der extrahierbaren Wirkstoffanteile geführt haben und somit die geringeren Wiederfindungen erklären. Auch Studien von Kreuzig et al. zeigten die intensivere Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände, mit zunehmendem Trockenmassegehalt der Gülle (Kreuzig et al., 2007). Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung könnten zudem einen Einfluss auf abiotische Abbauprozesse nehmen. Dies wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht.

5.4 Antibiotikagehalte in Aufwuchspflanzen

Anhand der durchgeführten Aufwuchsversuche in Mitscherlichgefäßen konnte ein Transfer von Antibiotika aus güllegedüngten Böden in die beiden Pflanzenarten „Deutsches Weidelgras (*Lolium perenne*; Familie der Süßgräser) und Möhren (*Daucus carota*)“ nachgewiesen werden. Sulfamethazin und dessen acetylierter Metabolit wurden in das Weidelgras aufgenommen. Alle vier Testsubstanzen wurden in den Möhren wiedergefunden. Zusätzlich waren der acetylierte Metabolit des Sulfamethazins und die Isoform des (Epi)-Chlortetracyclins in den Möhren nachweisbar. Die Wirkstoffgruppe der Sulfonamide zeigte in der Möhre eine Verlagerung bis in das Möhrengrün.

5.4.1 Antibiotikaubergang in Deutsches Weidelgras der Sorte „Lemmos“

Bei dem Weidelgrasaufwuchs waren die Wirkstoffaufnahmen in die Pflanze von der Antibiotikakonzentration in der Gülle und dem verwendeten Bodentyp abhängig (**Tabelle B-1**, **Tabelle B-2**, **Abbildung 4-16**, **Abbildung 4-17**, **Abbildung 4-18**).

Die Untersuchungen des Weidelgrases zeigten einen Übergang von Sulfamethazin in alle Grasschnitte, die auf Volkmarser Sandboden wuchsen, welcher mit Sulfamethazin-haltiger Gülle gedüngt wurde. Die Sulfamethazintrückstände in Grasschnitten, deren Boden mit 20 mg Sulfamethazin je kg Gülle beaufschlagt wurde, lagen im Bereich von 15,4 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ (Schnitt 1) und 4,7 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ (Schnitt 5). Graspflanzen, deren Boden mit Rindergülle gedüngt wurde, die eine Sulfamethazinkonzentration von 50 mg kg^{-1} enthielt, wiesen Gehalte im Bereich von 48,6 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ (Schnitt 1) bis 7,6 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ (Schnitt 5) auf. Die höchsten Sulfamethazingehalte waren in Graspflanzen nachweisbar, die auf Boden wuchsen welcher, mit 100 mg Sulfamethazin je kg Gülle („worst-case“-Konzentration) gedüngt wurde. Hier lagen die quantifizierbaren Gehalte im Bereich von 217,9 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ (Schnitt 1) bis 24,3 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ (Schnitt 5). Gräser, welche auf Baunataler Lößboden wuchsen, wiesen deutlich geringere Konzentrationen an Sulfamethazin auf. Eine Quantifizierung oberhalb der Bestimmungsgrenze war zudem nicht in allen Grasschnitten und Ansätzen möglich. So konnte in dem 20 mg kg^{-1} -Ansatz kein Sulfamethazin nachgewiesen werden, während in Grasproben des 50 mg kg^{-1} -Ansatzes 17,2 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ (Schnitt 1) bis 9,1 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ (Schnitt 5) und in Gräsern des 100 mg kg^{-1} -Ansatzes 48,1 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ (Schnitt 1) bis 17,2 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ (Schnitt 5) Sulfamethazin nachweisbar waren.

Die ebenfalls dotierten Wirkstoffe Chlortetracyclin, Doxycyclin und Sulfamethoxazol konnten für keine der Dotierniveaus in den Grasaufwüchsen nachgewiesen werden. Stattdessen war jedoch der Metabolit *N*-Acetyl-Sulfamethazin in einigen Grasproben bestimmbar. Dieser Metabolit war zum Zeitpunkt der Düngung nicht in der Gülle nachweisbar. Des Weiteren konnte es nach der Ernte der Pflanzen nicht im Versuchsboden detektiert werden. Dies könnte für eine Bildung im Rhizosphärenbereich oder in der Pflanze selbst sprechen und wird in **Kapitel 5.4.4** gesondert diskutiert.

Anhand der Versuchsergebnisse können mehrere Aussagen in Bezug auf das Aufnahmeverhalten ausgewählter Tetracycline und Sulfonamide in Deutsches Weidelgras getroffen werden. Die Untersuchungen zeigten, dass Unterschiede sowohl innerhalb einer Wirkstoffgruppe als auch zwischen den beiden Wirkstoffgruppen bestehen.

Aus der Wirkstoffgruppe der Sulfonamide konnte Sulfamethazin von dem Weidelgras aufgenommen werden. Da alle Grasschnitte oberhalb der Bodenoberfläche entnommen wurden, kann von einer Sulfamethazin-Aufnahme über das Wurzelsystem mit einer anschließenden Verlagerung über das Xylem ausgegangen werden. Der zweite Vertreter aus der Wirkstoffgruppe der Sulfonamide, Sulfamethoxazol, war hingegen nicht in dem Weidelgras nachweisbar. Dieser Wirkstoff unterlag im Zuge des anaeroben Fermentationsprozesses nachweislich einer stärkeren Eliminierung als Sulfamethazin (**Abbildung 4-20**). Am letzten Fermentationstag war Sul-

famethoxazol nicht mehr in der Gülle quantifizierbar (**Tabelle B-3**, vgl. **Kapitel 5.2**), was dessen Negativbefund in der Pflanze erklärt. In Arbeiten von Ahmed et al., die das Aufnahmeverhalten von Sulfamethazin und Sulfamethoxazol in Gurken, Tomaten und Salat untersuchten, konnten Gemeinsamkeiten in Bezug auf das Aufnahmeverhalten der beiden Wirkstoffe herausgestellt werden, wenn diese in der gleichen Wirkstoffkonzentration ohne Gülle in den Boden eingebracht werden (Ahmed et al., 2015). Die beiden Tetracycline (Epi)-Chlortetracyclin und (Epi)-Doxycyclin konnten nach der Güllefermentation noch in der Gülle nachgewiesen werden. Mit der Abnahme der (Epi)-Chlortetracyclinkonzentration konnte die Bildung des Transformationsproduktes (Epi)-iso-Chlortetracyclin in der Gülle bestimmt werden. Trotz des Eintrages dieser drei Stoffe über die Gölledüngung in den Versuchsboden, waren diese nicht in dem Weidelgras quantitativ bestimmbar. Die Divergenz im Aufnahmeverhalten der Tetracycline und Sulfonamide kann anhand der Unterschiede in dem Sorptionsverhalten dieser Antibiotika an Böden erklärt werden (vgl. **Kapitel 5.3**). Die Sorptionskoeffizienten für Tetracycline sind größer als die der Sulfonamide, was bedeutet, dass Sulfonamide eine größere Bioverfügbarkeit für Pflanzen aufweisen (Avisar et al., 2010; Pan and Chu, 2017a). Da lediglich die oberirdischen Pflanzenteile auf den Antibiotikagehalt untersucht wurden, kann anhand der Ergebnisse keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine Aufnahme der Tetracycline über die Wurzeln des Weidelgrases stattgefunden hat. Es ist denkbar, dass die Tetracycline über die Wurzel aufgenommen und anschließend nicht weiter über den Xylemsaft in der Pflanze verteilt wurden und somit in der Wurzel akkumulieren. Ein solches Verhalten konnte bereits für Reispflanzen, Sojabohnen und Luzernen beobachtet werden (Boonsaner and Hawker, 2012, 2010; Kong et al., 2007).

Des Weiteren geht aus der Aufwuchsstudie hervor, dass höhere Sulfamethazin-Konzentrationen im Boden zu höheren Rückstandsgehalten in dem Weidelgras führen. Auch andere Studien belegen diese Feststellung. Kumar et al. beschrieben beispielsweise für die Chlortetracyclin-aufnahme in grüne Zwiebeln, Mais und Kohl einen solchen Zusammenhang. Dolliver et al. beobachteten für Sulfamethazin einen Konzentrationsanstieg in Kartoffeln mit der Zunahme der zur Verfügung stehenden Antibiotikakonzentration im Gülle-Boden-Gemisch (Dolliver et al., 2007; Kumar et al., 2005b). Auch Ahmed et al. untermauern mit ihren Untersuchungen ein solches Verhalten für die Aufnahme von Tetracyclinen und Sulfonamiden in Gurken, Tomaten und Salat (Ahmed et al., 2015). Dies zeigt, dass Düngemittelanwendungen in höheren Frequenzen durchaus die Antibiotikaaufnahme in die Pflanzen steigern könnten.

Zudem konnte eine Tendenz zu abnehmenden Sulfamethazingehalten mit jedem zunehmenden Grasschnitt festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Zunahme der Adsorption des Wirkstoffes an den Boden mit zunehmender Kontaktzeit sein. Dies kann zu der Formung nicht-extrahierbarer Rückstände beitragen (siehe Fußnote 17). Detailliertere Ausführungen hierzu sind **Kapitel 5.3** zu entnehmen. Aus den genannten Bindungsmechanismen resultiert eine Konzentrationsabnahme der Wirkstoffe im Bodenporenwasser. Die Bioverfügbarkeit für die Pflanze sinkt. Chung et al. beobachteten beispielsweise die Abnahme der Wirkstoff-

konzentrationen von Chlortetracyclin und Sulfathiazol im Boden mit zunehmender Versuchsdauer (Chung et al., 2017). Chatterjee et al. geben zudem Hinweise auf eine Sorptionszunahme an Feststoffe mit der Verweilzeit im Boden (Bailey et al., 2016; Chatterjee et al., 2014). Auch ein mikrobieller Abbau des Sulfamethazins im Laufe der Aufwuchsperiode ist denkbar. Sowohl Mikroorganismen aus dem Boden, als auch aus der Gülle könnten hieran beteiligt sein. Insbesondere die im Porenwasser gelösten, bioverfügbaren Wirkstoffe sind für einen mikrobiellen Abbau angreifbar. Dies würde zum einen die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes für die Pflanze senken, kann im Umkehrschluss jedoch auch zu einer Aufnahme unbekannter Transformationsprodukte und Metabolite führen. Accinelli et al. konnten eine schnellere Eliminierung des Sulfamethazins in nicht-autoklavierten Böden im Vergleich zu autoklavierten Böden herausstellen, was für einen mikrobiellen Abbau spricht (Accinelli et al., 2007). Chlortetracyclin zeigte hingegen kein unterschiedliches Verhalten in sterilen und nicht-sterilen Böden (Allaire et al., 2006). Des Weiteren ist eine Auswaschung (leaching) des Sulfamethazins mit dem Gießwasser in tieferliegende Bodenschichten möglich. Anhand der schichtweisen Untersuchung der Lysimeterböden konnte bereits eine Wirkstoffverfrachtung bis in tiefere Bodenschichten (bis 50 cm) bestätigt werden (**Abbildung 4-39**, **Abbildung 4-40**). Erfolgt eine Auswaschung in Bereiche in der die Pflanze lediglich geringe bis keine Wurzeläusläufer ausgebildet hat, kann keine oder nur eine verringerte Aufnahme erfolgen. Deutsches Weidelgras erreicht eine maximale Wurzeltiefe von 10 cm (Elfrich, 2012). Somit sind auch die pflanzenspezifischen Eigenschaften, wie die Ausbildung des Wurzelsystems, entscheidend. Ein komplexes Zusammenspiel der genannten abiotischen und biotischen Faktoren sorgt für einen Rückgang der frei verfügbaren Antibiotikakonzentration im Boden. Die Bodenanalyse nach der viermonatigen Aufwuchsperiode zeigte, dass nur noch ein geringer Teil des Sulfamethazins ($\leq 4\%$) im Boden unter den angewendeten Extraktionsbedingungen (Mischung aus McIlvaine-Puffer pH 6 und Methanol bei 60 °C im Ultraschallbad) analytisch erfassbar ist. Aufgrund des Lösungsmitelesinsatzes und der hohen Temperatur im Zuge der Extraktion, wird der pflanzenverfügbare Anteil als geringer eingeschätzt. Die tatsächlich im Boden enthaltenen Rückstände könnten hingegen durch die Bildung nicht-extrahierbarer und gebundener Rückstände, sowie durch Sequestrierungsprozesse höher sein. Hier könnte wie bereits in **Kapitel 5.3** erwähnt eine Limitierung der Extraktionsmethode vorliegen, wodurch diese Anteile analytisch nicht erfasst werden. Neben Sulfamethazin waren auch je $\leq 10\%$ (Epi)-Chlortetracyclin und (Epi)-Doxycyclin in den Versuchsböden nachweisbar. Aufgrund der Persistenz der Wirkstoffe im Boden, könnte die Desorption und die damit verbundene Remobilisierung der gebundenen oder sequestrierten Rückstände im Laufe der Jahre eine Rolle spielen. Dies könnte beispielsweise über Bodenerosionsprozesse initiiert werden (Müller et al., 2003). Eine Aufnahme in Pflanzen, welche mehrjährig wachsen, wäre somit nicht ausgeschlossen.

Die durchgeführte Aufwuchsstudie zeigt ferner, dass deutlich höhere Sulfamethazinkonzentrationen in Weidelgras aufgenommen wurden, welches auf Volkmarser Sandboden wuchs. Auch Goldstein et al. konnten ein größeres Aufnahme- und Akkumulationspotential von Antibiotika in Pflanzen feststellen, die auf Böden kultiviert wurden, welche einen geringen organischen

Gehalt und Tonanteil aufwiesen (Goldstein et al., 2014). Die größten Unterschiede in Bezug auf die physikalisch-chemischen Bodeneigenschaften der gewählten Versuchsböden liegen in dem Gehalt an Tonminerale und dem Kationengehalt. Aufgrund des hohen Tonanteils im Lössboden, wurde diesem bereits in **Kapitel 5.3** eine hohe Kationenaustauschkapazität zugesprochen. Hieraus resultiert eine starke Adsorption der Antibiotika an den Lössboden (Aristilde et al., 2016; Röder et al., 2007). Die Adsorption von Sulfonamiden und Tetracyclinen an den Oberflächen und in den Zwischenschichten von Tonmineralen wurde bereits nachgewiesen (Figuroa et al., 2004; Gao and Pedersen, 2005; Kulshrestha et al., 2004). Dies spiegelt sich auch in den höheren K_d -Werten der Substanzen in Lössböden wider (Boxall et al., 2002; Thiele, 2000; Thiele-Bruhn, 2003). Hierdurch sinkt die Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe für die Pflanzen. In diesem Zusammenhang sei auf **Kapitel 5.3** verwiesen. Das Bodengefüge zeigt ebenfalls große Unterschiede. Im Sandboden liegen die Bodenteilchen lose nebeneinander vor. Er wird als Einzelkorngefüge beschrieben und weist eine geringe Wasserspeicherkapazität auf. Lössböden zeigen ein Kohärentgefüge, die Bodenteilchen sind miteinander verklebt und es resultiert ein hohes Wasserspeicher- und Quellvermögen. Rosendahl et al. beschrieben, dass mit der Feuchtigkeit im Boden eine Zunahme der Bindungsstellen an SOM korreliert (Rosendahl et al., 2011). Dies könnte zu einer Verringerung des pflanzenverfügbaren Wirkstoffgehaltes im Lössboden führen und untermauert die Ergebnisse dieser Arbeit.

5.4.2 Antibiotikaübergang in Möhren der Sorte „Almaro“

Bei dem Möhrenaufwuchs waren die Antibiotikaaufnahme und die Verteilung der Antibiotika in die einzelnen Pflanzenkompartimente ebenfalls wirkstoffspezifisch. Zudem waren die Aufnahmeleistungen von der Güllevorbehandlung abhängig (**Tabelle B-6**, **Tabelle B-7**, **Abbildung 4-26** bis **Abbildung 4-30**). In den Möhren konnten alle dotierten Antibiotika nachgewiesen werden.

Die höchsten Antibiotikagehalte aller Wirkstoffe wurden in den Möhrenwurzeln detektiert. Im Aufwuchsansatz mit *gelagerter Gülle* wiesen die Wurzeln noch 1,2 % Chlortetracyclin, 4,6 % Doxycyclin, 32,9 % Sulfamethoxazol und 10,5 % Sulfamethazin in Bezug auf die ursprünglich dotierte Konzentration auf. Die Möhrenschnitten wiesen die zweithöchsten Antibiotikagehalte auf. Diese enthielten 0,1 % Chlortetracyclin, 0,6 % Doxycyclin, 2,9 % Sulfamethoxazol und 1 % Sulfamethazin bezogen auf die ursprüngliche Konzentration im Boden. In der Möhrenrübe waren Spuren an Doxycyclin (0,04 %), sowie 3,5 % Sulfamethoxazol und 0,3 % Sulfamethazin gemäß der ursprünglichen Menge quantitativ enthalten. Im Möhrengrün waren lediglich 0,7 % Sulfamethoxazol und 0,8 % Sulfamethazin der Ursprungskonzentration nachweisbar. Die Rückstandsgehalte in Ansätzen mit *fermentierter Rindergülle* waren deutlich höher als die der gelagerten Ansätze. Bezogen auf die dotierte Antibiotikamenge waren 26,2 % Chlortetracyclin, 18,5 % Doxycyclin und 19,3 % Sulfamethazin in den Möhrenwurzeln nachweisbar. In der Möhrenschnitte waren 0,3 %, 4,4 % und 1,2 % der dotierten Konzentration an Chlortetracyclin, Doxycyclin und Sulfamethazin nachweisbar. Die Möhrenrübe wies lediglich Rückstände

an Doxycyclin (0,2 % der dotierten Menge) und Sulfamethazin (0,4 % der dotierten Menge) auf. In dem Möhrengrün wurde Sulfamethazin (1,4 % der dotierten Menge) nachgewiesen. Die Verlagerung in die einzelnen Pflanzenkompartimente (Wurzel, Schale, Rübe, Grün) war wirkstoffspezifisch. In **Abbildung 5-5** ist eine quantitative Reihung der Verlagerung dargestellt.

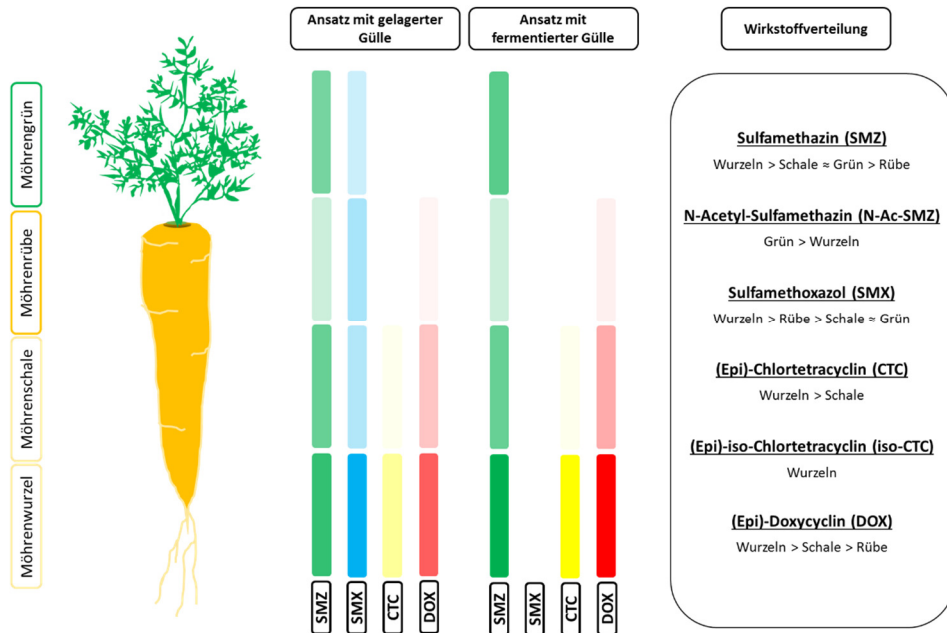


Abbildung 5-5: Verteilung der Antibiotikawirkstoffe in den Möhrenkompartimenten. Die Zunahme der Farbinintensität ist analog zur Zunahme der Wirkstoffkonzentration.

Studien von Eggen et al., Kurwadkar et al., Migliore et al. und Ahmed et al. beobachteten für Gerste, Möhren, Luzerne, Gurken, Tomaten und Salat ebenfalls die höchsten Wirkstoffkonzentrationen in den Wurzeln der untersuchten Pflanzen (Ahmed et al., 2015; Eggen et al., 2011; Goldstein et al., 2014; Kurwadkar et al., 2017; Migliore et al., 1996), was die Ergebnisse dieser Arbeit untermauert. Dolliver et al. untersuchten das Aufnahmeverhalten von Sulfamethazin in Kartoffeln. Auch hier war die höchste Wirkstoffkonzentration in den Wurzeln und der Schale zu finden. Die Autoren nannten als möglichen Grund eine äußerliche Adsorption bedingt durch den direkten Kontakt zum antibiotikahaltigen Boden. Eine Diffusion der Antibiotika über die Schale ins Pflanzeninnere wurde ebenfalls als Möglichkeit in Betracht gezogen, zumal der Sulfamethazingehalt von der Schale ins Pflanzeninnere abnahm (Dolliver et al., 2007). In Studien von Boxall et al. wurde zudem eine höhere Antibiotika-Akkumulation in Karottenschalen festgestellt (Boxall et al., 2006). Eine konkrete Aussage darüber, ob die Substanzen bei dem vorliegenden Aufwuchsversuch lediglich äußerlich anhafteten oder in das Pflanzeninnere aufgenommen wurden lässt sich nicht abschließend klären. Es wäre denkbar, dass geringe Mengen Boden trotz Säuberung der Wurzeln und der ungeschälten Rüben noch an diesen anhafteten.

Die Mechanismen für die Antibiotikaaufnahme in Pflanzen sind bislang nicht vollständig verstanden (Pan and Chu, 2017a) (**Kapitel 1.7.2**). Erklärungsansätze in der Literatur fehlen oder sind widersprüchlich. Tetracycline und Sulfonamide sind ionisierbare Substanzen, die abhängig von dem umgebenden pH-Wert dissoziieren. Die Dissoziationskonstanten der verwendeten

Wirkstoffe sind in **Tabelle 5-1** gegenübergestellt. Tetracycline werden über drei pK_a -Werte beschrieben, Sulfonamide über zwei. Im Folgenden wird das beobachtete Aufnahme- und Verteilungsverhalten der vier dotierten Antibiotika in der Möhre diskutiert. Dies geschieht anhand des Dissoziationsverhaltens der Wirkstoffe in Abhängigkeit des Boden- und Pflanzen-pH-Wertes.

Tabelle 5-1: Dissoziationskonstanten ausgewählter Tetracycline und Sulfonamide.

Wirkstoffe	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	Literatur
Chlortetracyclin	3,33	7,55	9,33	(Qiang and Adams, 2004)
Doxycyclin	3,02	7,97	9,15	(Qiang and Adams, 2004)
Sulfamethazin	2,07	7,49		(Qiang and Adams, 2004)
Sulfamethoxazol	1,85	5,60		(Qiang and Adams, 2004)

Sulfonamide liegen bei einem pH-Wert kleiner des pK_{a1} -Wertes als Kation durch Protonierung der Aminogruppe vor (1). Bei $pK_{a1} < pH < pK_{a2}$ liegen Sulfonamide zum größten Teil neutral vor (2) und bei $pH > pK_{a2}$ dominiert die anionische Form durch Deprotonierung der Sulfonsäureamid-Gruppe (3) (**Abbildung 5-6**).

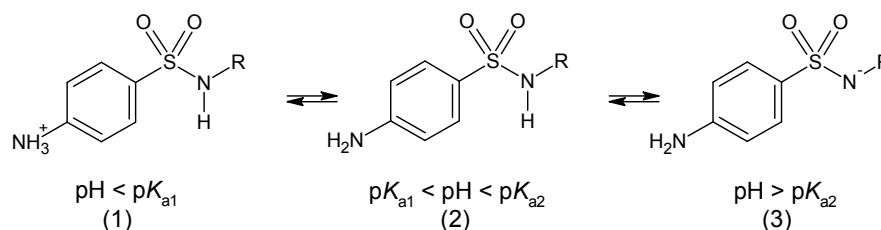


Abbildung 5-6: Dissoziation von Sulfonamiden. Modifiziert nach (Avisar et al., 2010).

Bei Tetracyclinen herrscht die Kationenform (+00) durch Protonierung der Dimethylammonium-Gruppe (1) bei einem pH-Wert kleiner des pK_{a1} vor. Die Zwitterionen-Form (+-0) entsteht durch die Deprotonierung der OH-Gruppe an C₃ (2) bei $pK_{a1} < pH < pK_{a2}$. Das Anion (+-- (3) oder 0--)) wird bei $pH > pK_{a2}$ durch die Protonenabgabe an der Phenoldiketon-Struktur gebildet (**Abbildung 5-7**) (Sithole and Guy, 1987).

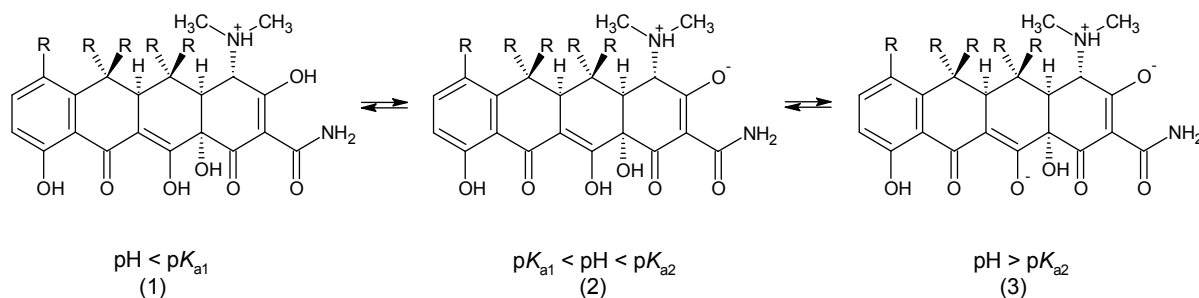


Abbildung 5-7: Dissoziation von Tetracyclinen. Modifiziert nach (Avisar et al., 2010).

Die pH-Werte der Versuchsböden „Volkmarser Sand“ und „Baunataler Löß“ liegen mit 6,8 und 7,4 im neutralen Bereich (**Tabelle 3-11**). Aus **Abbildung 5-8** und **Tabelle 5-2** ist erkenntlich, dass Sulfamethazin in dem pH-Bereich des Sandbodens hauptsächlich in seiner neutralen Form (85 %) vorliegt. Im Lößboden herrscht hingegen ein ausgeglichenes Verhältnis der neutralen (55 %) zur anionischen (45 %) Spezies vor. Sulfamethoxazol steht im Boden aufgrund des geringeren pK_{a2} -Wertes von 5,6 zum größten Teil in der anionischen Form (94 % bis 98 %) der Pflanze zur Verfügung. Im Sandboden liegen Chlortetracyclin und Doxycyclin zu 85 % und 94 % zwitterionisch und zu 15 % und 6 % anionisch vor. Im Lößboden ist der Anteil der zwitterionischen Form etwas geringer. Dieser beträgt für Chlortetracyclin 59 % und für Doxycyclin 79 %. Die zwitterionische Form der Tetracycline kann über die in **Kapitel 5.3** genannten Mechanismen starke Wechselwirkungen mit dem Boden eingehen (Avisar et al., 2010; Kulshrestha et al., 2004).

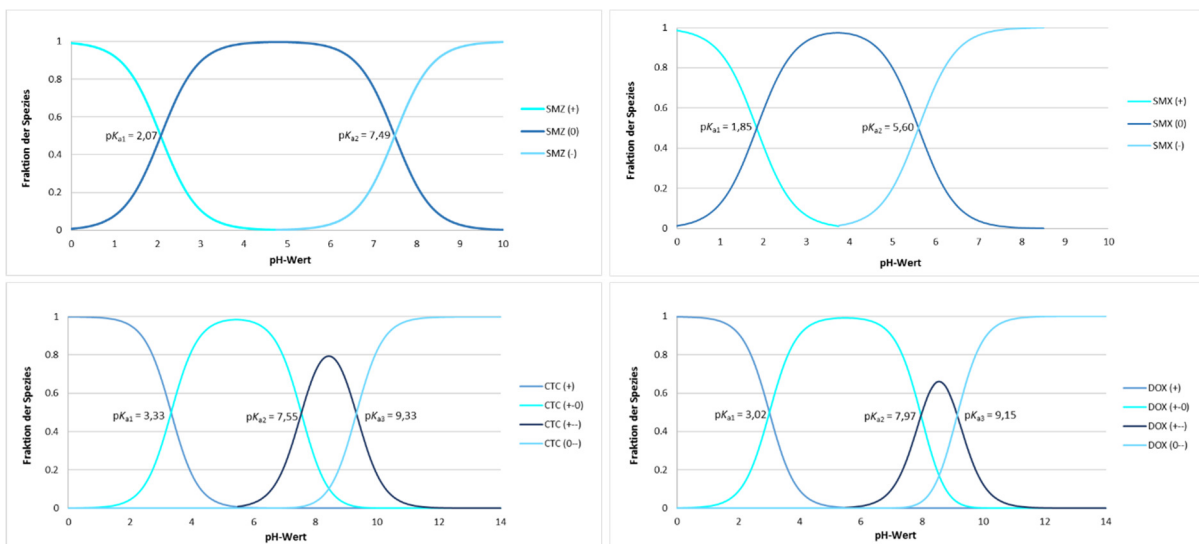


Abbildung 5-8: Dissoziationskurven für die in dieser Arbeit untersuchten Sulfonamide (oben) und Tetracycline (unten).

Tabelle 5-2: Dissoziationsverhalten der Tetracycline und Sulfonamide in Abhängigkeit des umgebenden Milieus.

	Sandboden	Lößboden	Apoplast / Xylem	Cytoplasma	Phloem
pH	6,8	7,4	5 – 6	7 – 7,5	8
CTC	85 % zwitterionisch 15 % anionisch	59 % zwitterionisch 41 % anionisch	98 % zwitterionisch 2 % anionisch	66 % zwitterionisch 34 % anionisch	71 % anionisch (+--) 25 % zwitterionisch 4 % anionisch (0--)
DOX	94 % zwitterionisch 6 % anionisch	79 % zwitterionisch 21 % anionisch	100 % zwitterionisch	84 % zwitterionisch 16 % anionisch	50 % anionisch (+--) 47 % zwitterionisch 3 % anionisch (0--)
SMZ	83 % neutral 17 % anionisch	55 % neutral 45 % anionisch	99 % neutral 1 % anionisch	63 % neutral 37 % anionisch	76 % anionisch 24 % neutral
SMX	94 % anionisch 6 % neutral	98 % anionisch 2 % neutral	56 % neutral 44 % anionisch	98 % anionisch 2 % neutral	100 % anionisch

Wie in **Kapitel 5.3** herausgestellt, ist die Bindung von Tetracyclinen an Bestandteile des Bodens stärker als die der Sulfonamide. So zeigten die Tetracycline in den Lysimeterböden eine Persistenz im Oberboden, während die Sulfonamide mit dem Sickerwasser in die Bodeneluat gelangten. Zudem untermauern die in der Literatur genannten K_d -Werte die deutlich bessere Bioverfügbarkeit der Sulfonamide im Boden. Eine Pflanzenaufnahme der Sulfonamide wird aufgrund dessen als wahrscheinlicher betrachtet (Figueroa-Diva et al., 2010; Pan and Chu, 2016).

Wie bereits in **Kapitel 1.7** erwähnt, wird nach Literaturangaben die Meinung vertreten, dass neutrale Substanzen bevorzugt über die Wurzeln aufgenommen werden, während geladene Substanzen die Biomembranen nur sehr langsam passieren können (Trapp and Legind, 2011). Auch Malchi et al. untermauern dies, indem sie nicht-ionische Pharmaka in deutlich höheren Konzentrationen in Kartoffeln und Möhren fanden, als ionische Substanzen (Malchi et al., 2014). Die neutrale Form des Sulfamethazins sollte gemäß der vorliegenden Erkenntnis aus Literaturdaten daher gut von Pflanzen aufgenommen werden. Der interzelluläre Raum (Apoplast) und das Xylem weisen einen pH von 5 – 6 auf (Goldstein et al., 2014). Sulfamethazin liegt dort aufgrund der Dissoziationskonstanten zu 99 % in der neutralen Form vor. Eine Translokation dieser Substanz über den Xylem-Saft in oberirdische Pflanzenkompartimente ist aufgrund der Stoffeigenschaften wahrscheinlich (Mathews and Reinhold, 2013). Auch bei einer Aufnahme des Wirkstoffes über den symplastischen Weg ist der Großteil des Sulfamethazins im Cytoplasma neutral (63 %) und gut verlagerbar. Der Nachweis des Sulfamethazins in allen Pflanzenkompartimenten bis hinein in das oberirdische Möhrengrün bestätigt die gute Translokation innerhalb der Pflanze in der Praxis. Sulfamethoxazol besitzt im Gegensatz zu Sulfamethazin einen niedrigeren pK_{a2} -Wert. Der Wirkstoff müsste aufgrund des Vorherrschens der Anionenform eine bessere Bioverfügbarkeit im Boden aufweisen als Sulfamethazin (vgl. **Kapitel 5.3**). Eine geringe Sorptionsneigung an den Boden, spricht jedoch nicht uneingeschränkt für eine gute Pflanzenaufnahme. Laut Trapp und Legind wird die Aufnahme der anionischen Wirkstoffform als langsamer Prozess verstanden (Trapp and Legind, 2011). Als Grund hierfür wird das negative elektrische Zellmembranpotential genannt, was zu repulsiven Wechselwirkungen mit dem Anion führt (Devillers, 2009; Schopfer and Brennicke, 2010). Der Nachweis des Wirkstoffes im oberirdischen Möhrengrün lässt dennoch darauf schließen, dass ein Teil des Wirkstoffes über die Wurzel oder die Schale aufgenommen und weiter mit dem Xylem-Saft verlagert wurde. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Pflanzen in der Lage sind, eine pH-Wert-Änderung im Rhizosphärenbereich (2 – 3 mm um die Wurzel) durchzuführen (Cheng and Kuzyakov, 2005; Hinsinger et al., 2003; Marschner et al., 1986). Hierdurch können die oben genannten Gleichgewichtsreaktionen verschoben werden. Im Falle einer pH-Wert-Absenkung ist die Aufnahme von Sulfamethoxazol begünstigt, da sich das Säure-Base-Gleichgewicht hin zur neutralen Form des Sulfamethoxazols verschiebt. In diesem Fall könnte eine Aufnahme stattfinden. Erfolgt die Aufnahme des Sulfamethoxazols über den apoplastischen Weg, ist aufgrund des pH-Wertes des interzellulären Raumes und des Xylems eine gute Verlagerung mit

dem Xylem-Saft in obere Pflanzenbereiche möglich, da die Substanz dort pH-bedingt hauptsächlich neutral vorliegt (56 %). Die anionische Form könnte hingegen aufgrund repulsiver Wechselwirkungen mit geladenen Zellmembranen in ihrem Transport gehindert sein. Bei Eintritt in die Wurzel über den symplastischen Weg, ist das Durchqueren des Cytoplasmas nötig. In dem Cytoplasma der Pflanze (pH 7 – 7,5) liegt der Wirkstoff zu 98 % anionisch vor. Die Mobilität der anionischen Form kann durch ion-trapping eingeschränkt sein, was zu einer Akkumulation des Wirkstoffes in der Wurzel geführt haben könnte. Diese Vermutung wird durch die hohen Wirkstoffnachweise in der Wurzel untermauert.

Im Boden dominiert die zwitterionische Form der Tetracycline. Es gibt derzeit wenige Arbeiten über die Aufnahme und Akkumulation von zwitterionischen chemischen Spezies durch Pflanzen (Boonsaner and Hawker, 2012). Die Passage der Biomembranen wird durch die Ladungen nur in begrenztem Maße stattfinden. Im Apoplasten und im Xylem dominiert die Zwitterionenform. Bei Transport über den Apoplasten oder transmembranen Weg wäre eine Verlagerung in weitere Pflanzenteile denkbar. Repulsive Wechselwirkungen mit den Ladungen der Zellmembranen könnten diesen jedoch hindern. Der symplastische Weg wird aufgrund der Membranpassagen und deren Ladungen ebenfalls verlangsamt sein, da hier neben der zwitterionischen Form noch die anionische Form zu 34 % vorliegt. Bei dem vorliegenden Möhrenaufwuchs konnten Tetracycline in der Wurzel und der Schale nachgewiesen werden. Wie oben erwähnt, könnte dies durch äußerlich anhaftende Bodenbestandteile bedingt sein. Eine Aufnahme über die Wurzeln könnte jedoch ebenfalls stattgefunden haben. Aufgrund der Ladungen wird jedoch vermutet, dass durch ion-trapping die Translokation aus der Wurzel in andere Pflanzenteile eingeschränkt ist und es in der Wurzel zu einer Akkumulation kommt. Die Verlagerung der Tetracycline bis in das Möhrengrün konnte in der Praxis nicht bestätigt werden und würde diese Vermutung untermauern. In verschiedensten Veröffentlichungen wurden Tetracycline in oberirdischen Pflanzenteilen wie Blättern und Halmen nachgewiesen (Ahmed et al., 2015; Azanu et al., 2016) (**Tabelle C-6** bis **Tabelle C-9**). Dies steht im Gegensatz zu den gewonnenen Erkenntnissen dieser Arbeit. Der Diskussionsteil zu der veröffentlichten Literatur enthält meist keine Angaben über den vorliegenden Ladungszustand der Wirkstoffe in dem Expositionsmedium und den Pflanzenkompartimenten. Eine Erklärung für das beobachtete Aufnahmeverhalten, wie in dieser Arbeit vorgenommen wurde, ist nicht gegeben. Ein maßgebender Unterschied zwischen den beiden genannten Arbeiten und dieser Arbeit besteht in der Versuchsdurchführung. Während in dieser Arbeit die Antibiotikazufuhr über Gülle erfolgte, wurde bei den beiden beschriebenen Versuchen eine Antibiotikadotierung über das Gießwasser vorgenommen. Somit ist nicht auszuschließen, dass die nachgewiesenen Antibiotika äußerlich an den Blättern anhafteten oder über diese aufgenommen wurden. Bei Aufnahme der Wirkstoffe über die Blätter ist ebenfalls eine Wirkstoffverlagerung in untere Pflanzenteile über das Phloem möglich. Die Ausbildung des Wurzelsystems kann ebenfalls die Pflanzenaufnahme beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurden Samen von Weidelgras und Möhren in den mit antibiotikahaltiger Gülle gedüngten Versuchsboden ausgesät. Bei den genannten Studien erfolgte zunächst eine zweiwöchige Aufzucht der Pflanzen. Die jungen Pflanzen wurden nach Ausbildung des Wurzelsystems

2 x wöchentlich gegenüber antibiotikahaltigem Gießwasser exponiert. Die absolut aufgebrauchten Antibiotikagehalte waren zudem deutlich höher als in dieser Arbeit. Des Weiteren spielt die Boden-Wirkstoff-Interaktion einen entscheidenden Faktor, der in der vorliegenden Arbeit mitberücksichtigt wurde. Die Zusammensetzung des Bodens nimmt einen maßgebenden Einfluss auf den Rückhalt der Tetracycline. Sie sorbieren stark an Bodenpartikel, was deren Bioverfügbarkeit für die pflanzliche Aufnahme und Degradationsprozesse herabsetzt (vgl. **Kapitel 5.3**) (Ahmed et al., 2015; Hu et al., 2010b; Lunestad and Goksøyr, 1990; Wu et al., 2015).

Neben dem Ladungszustand, wird in der Literatur auch häufig die molare Masse als limitierender Faktor für eine gute Pflanzenverfügbarkeit von Wirkstoffen angesehen. Kumar und Gupta stellten eine bevorzugte Antibiotikaaufnahme in Pflanzen für Wirkstoffe mit einem Molekulargewicht $< 300 \text{ g mol}^{-1}$ heraus (Kumar and Gupta, 2016). Auch Reitz et al. untermauerten diesen Zusammenhang, indem die Autoren für Wirkstoffe mit einem Molekulargewicht $< 390 \text{ g mol}^{-1}$ eine höhere Antibiotikaaufnahme postulierten (Reitz et al., 2016). Die beiden Sulfonamide erfüllen diese Kriterien, während die Tetracycline ein höheres Molekulargewicht aufweisen, was ebenfalls für deren verminderte Pflanzenaufnahme sprechen könnte. Des Weiteren konnten Lipinski et al. und Ghose et al. in ihren Forschungsarbeiten herausstellen, dass eine Wirkstoffaufnahme und deren Bioverfügbarkeit im menschlichen Organismus durch die zunehmende Anzahl der Donatoren bzw. Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen (OH, NH, O, N) in einem Molekül negativ beeinflusst wird (Ghose et al., 1999; Lipinski et al., 2012). Die beiden Tetracycline besitzen zehn H-Donatoren und –Akzeptoren, während die untersuchten Sulfonamide lediglich sechs H-Donatoren und –Akzeptoren im Molekül aufweisen. Die genannten Gründe lassen vermuten, dass ein Großteil der nachgewiesenen Tetracycline äußerlich an der Wurzeloberfläche und der Möhrenschaale anhaften. Durch die Wurzeläusläufer mit Wurzelhaaren und die Schale, besitzt die Möhre im Vergleich zu ihrem Volumen eine große Oberfläche. Diese Oberfläche bietet viele Bindungsplätze an denen Antibiotika adsorbieren können. Insbesondere für Wurzelgemüse können Tetracyclin-Kontaminationen somit von Bedeutung sein.

Trotz der geringeren Antibiotikaeliminierung im Zuge der Güllelagerung im Vergleich zur Fermentation (**Abbildung 4-31**, **Abbildung 4-32**) und den damit verbundenen höheren Antibiotikaeinträgen in den Versuchsboden, wurden in Möhren welche mit gelagerter Gülle gedüngt wurden niedrigere Konzentrationen an Chlortetracyclin, Doxycyclin und Sulfamethazin detektiert. Hierfür könnten die unterschiedlichen Trockenmassen der Güllen verantwortlich sein (**Tabelle 4-15**). Gelagerte Gülle wies mit 9,5 % eine deutlich höhere Trockenmasse auf als fermentierte Gülle mit nur 7,1 %. Durch die höhere Trockenmasse ist gelagerte Gülle viskoser und kann den Boden folglich schlechter durchdringen, was wiederum mit einer herabgesetzten Verteilung der Wirkstoffe im Boden korreliert. Des Weiteren adsorbieren Tetracycline und Sulfonamide an organische Bodensubstanz. Diese wird durch den Gülleeintrag (enthält z.B. Huminstoffe und organischen Kohlenstoff) erhöht und ist im Falle der Ansätze mit feststoffreicher gelagerter Gülle vermutlich höher als in Ansätzen mit fermentierter Gülle. Dies spricht für eine stärkere Bindung der Wirkstoffe an den Boden, welcher mit gelagerter Gülle beaufschlagt

wurde. Die Bodenanalyse bestätigte diese Vermutung. So enthielten Böden mit gelagerter Gülle nach der Ernte weniger Antibiotika. Dies kann auf die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände zurückgeführt werden. Die Verfügbarkeit für die Pflanzen ist verringert. Für eine ausführliche Erklärung des Sorptionsverhaltens der einzelnen Wirkstoffe im Boden (Bildung gebundener Rückstände, Sequestrierung) sei an dieser Stelle auf **Kapitel 5.3** verwiesen. Sulfamethoxazol war hingegen lediglich in Ansätzen mit gelagerter Gülle nachweisbar. Dies wird auf die Eliminierung des Wirkstoffes während der Fermentation zurückgeführt (**Tabelle B-8** bis **Tabelle B-10**).

5.4.3 Betrachtung der Ergebnisse im Kontext mit der Literatur

Zahlreiche Studien wurden bereits zur Aufnahme von Antibiotika in Pflanzen durchgeführt (Ahmed et al., 2015; Azanu et al., 2016; Boonsaner and Hawker, 2012, 2010; Boxall et al., 2006; Carter et al., 2014; Chitescu et al., 2013; Chung et al., 2017; Dolliver et al., 2007; Franklin et al., 2016; Freitag et al., 2008; Goldstein et al., 2014; Grote et al., 2009; Grote et al., 2007; Grote et al., 2006; Hawker et al., 2013; Herklotz et al., 2010; Holling et al., 2012; Jacobsen et al., 2004; Kang et al., 2013; Kong et al., 2007; Kumar et al., 2005b; Kurwadkar et al., 2017; Li et al., 2013; Liu et al., 2011; Michelini et al., 2015; Migliore et al., 1996; Pan and Chu, 2017a). Der Vergleich der erhobenen Daten aus den beiden Aufwuchsstudien dieser Arbeit untereinander und mit Untersuchungsergebnissen aus der Literatur (**Tabelle C-6** bis **Tabelle C-9**) erweist sich als schwierig, da sich die Aufwuchsstudien erheblich im Hinblick auf die Versuchsdurchführungen unterschieden. So wurden beispielsweise Pflanzen in Nährmedien (Hydrokultur) aufgezogen oder auf Versuchsböden kultiviert (Lysimeter-, Gefäß-, Freiland-, Gewächshausversuche), welche unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften aufwiesen (Sandboden, Lößboden). Des Weiteren wurden einige Studien unter künstlichen Temperatur- und Lichtverhältnissen durchgeführt, während Pflanzen anderer Studien realen Bedingungen ausgesetzt waren. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal lag in der Art der Antibiotikazugabe. Diese erfolgte im Falle von Hydrokulturen durch Dotierung der Nährlösung. Bei Aufwüchsen erfolgte die Wirkstoffzugabe über das Gießwasser, durch direkte Einmischung in den Boden oder über die Düngung mit antibiotikabelasteter Gülle (Pan and Chu, 2017a; Wu et al., 2015). Hierbei sind auch die Einarbeitungstiefe der Wirkstoffe, die verwendeten Konzentrationen und die Frequenzen der Antibiotikaeinträge entscheidend. Im Falle der Antibiotikazugabe über Gülle, wurde in einigen Studien eine direkte Anreicherung der tierischen Exkremente vorgenommen, in anderen Studien wiederum wurden Ferkel mit Antibiotika behandelt und deren Ausscheidungen zur Düngung verwendet. Bei letzterer Vorgehensweise können auch im tierischen Organismus gebildete Metabolite in den Ausscheidungen vorhanden sein, die ebenfalls in den Boden eingetragen werden. Ferner stammt die verwendete Gülle von verschiedenen Tierarten, einige verwendeten Schweinegülle, andere Rindergülle. Auch die Güllebehandlungen unterschieden sich (keine Behandlung, Lagerung, Fermentation, Sauerstoffbedingungen). Unterschiede in der Dauer der Fermentation und Lagerung führen zudem zu unterschiedlichen Eliminierungsraten der Wirkstoffe in der Gülle und damit verbunden zu veränderten Konzentrationseinträgen

in den Boden. Der Zeitpunkt der Antibiotikazugabe variierte zudem, so wurden einige Pflanzen auf antibiotikahaltigen Böden ausgesät, während andere Pflanzen erst in älteren Vegetationsstadien nach Ausbildung des Wurzelsystems gegenüber Antibiotika exponiert wurden. Nicht zuletzt sind auch die gewählten Pflanzenarten und die Aufwuchsperioden, sprich die Expositionszeiten, verschieden.

Aufgrund der zahlreichen genannten Unterschiede in Bezug auf die Versuchsdurchführungen, variieren die berechneten Aufnahmeleistungen. Bei hydroponisch (d.h. in Nährlösung) kultivierten Pflanzen ist der experimentelle Aufwand deutlich geringer als bei den durchgeführten Aufwuchsstudien dieser Arbeit. Das komplexere Pflanzen-Bodensystem berücksichtigt die Bioverfügbarkeit einer Verbindung im Versuchsboden, was gemäß den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit einen entscheidenden Einfluss auf die Wirkstoffaufnahmeleistungen in die Pflanzen nimmt. Transformationsprozesse in der Gülle und im Boden sowie Sorptionseffekte werden berücksichtigt. Aufwuchsstudien sind somit ein realitätsnaher Ansatz zur Abschätzung und Überprüfung des Umweltverhaltens von Schadstoffen. Der Versuchsboden zeigte sich als natürlicher Filter und so sind die nachgewiesenen Konzentrationen in Pflanzen, die in Nährmedien wuchsen, deutlich höher. Hydroponische Studien lassen sich nicht für eine Risikoabschätzung des Verbrauchers durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel heranziehen. Sie können lediglich Metabolismus, Aufnahme-, und Verteilungsprozesse innerhalb der Pflanze abbilden und besitzen eine hohe Reproduzierbarkeit.

In **Tabelle C-6** bis **Tabelle C-9** sind die in dieser Arbeit nachgewiesenen Gehalte an Tetracyclinen und Sulfonamiden in Weidelgras und Möhren sowie Untersuchungsergebnisse aus der Literatur zum Aufnahmeverhalten von Antibiotika in verschiedene Pflanzenarten dargestellt. Die deutlich höheren Aufnahmemengen der Sulfonamide im Vergleich zu Tetracyclinen wird auch anhand der Literaturdaten bestätigt. Tetracycline konnten in der vorliegenden Arbeit lediglich in unterirdischen Pflanzenteilen nachgewiesen werden. Chitescu et al. untersuchten ebenfalls das Aufnahmeverhalten von Tetracyclinen und Sulfonamiden in Weidelgras. Im Rahmen der Studie konnten die Autoren ebenfalls keine Tetracycline nachweisen. Der Nachweis von Sulfonamiden war hingegen positiv (Chitescu et al., 2013). Dies steht im Einklang mit den Erkenntnissen aus dieser Arbeit und bekräftigt die Annahme der stärkeren Sorption der Tetracycline an Bodenpartikel.

Andere Studien untermauern zudem, dass in den Wurzeln deutlich höhere Rückstandskonzentrationen nachweisbar sind, als in den Blättern der Pflanzen (Ahmed et al., 2015; Grote et al., 2009; Herklotz et al., 2010; Kurwadkar et al., 2017; Migliore et al., 1996). Auch die prozentualen Aufnahmeleistungen waren in anderen Studien gering. So zeigten die Aufwuchsstudien, dass Pflanzen meist weniger als 2 % der zugefügten Wirkstoffkonzentration aufnehmen können (Chitescu et al., 2013; Dolliver et al., 2007; Kumar et al., 2005b).

5.4.4 Bildung von Abbau- und Transformationsprodukten - Pflanzenmetabolismus

Für die geringen Transferraten der Antibiotika aus dem Gülle-Boden-Gemisch in die Pflanzen können auf der einen Seite die in **Kapitel 5.2** und **5.3** beschriebenen Sorptions- und Abbau- bzw. Transformationsmechanismen in der Boden- oder Güllematrix verantwortlich sein. Weiterhin können Abbau- und Transformationsprozesse im Rhizosphärenbereich oder in der Pflanze selbst stattfinden. Dem pflanzlichen Metabolismus werden Ähnlichkeiten zu dem menschlichen und tierischen Metabolismus zugeschrieben (Huber et al., 2012; Huber et al., 2009). Häufig wird die Bezeichnung „grüne Leber (green liver)“ verwendet. Der pflanzliche Metabolismus wird in drei Phasen unterteilt: Phase I ist eine Aktivierungsreaktion (enzymatische Einführung polarer funktioneller Gruppen), in Phase II bildet die Substanz bzw. deren Phase-I-Metaboliten Konjugate mit kleinen Biomolekülen (z.B. Glutathion, Glucose, Aminosäuren). Hierdurch soll die Hydrophilie und Mobilität der Ursprungssubstanz gesteigert werden. In Phase III kann die Substanz in die Vakuolen der Pflanze eingelagert oder gespalten und abgebaut werden. Des Weiteren ist die Bildung gebundener Rückstände mit den Zellwänden oder deren Verlagerung in andere Pflanzenteile möglich (Mathews and Reinhold, 2013; Wu et al., 2015). *N*-Acetyl-Sulfamethazin wurde im Grün des Weidelgrases und in den Wurzeln und Blättern der Möhren quantitativ nachgewiesen. In Gülle und Boden war *N*-Acetyl-Sulfamethazin nicht nachweisbar, was einen Eintrag über das Expositionsmedium nahezu ausschließt. Eine mögliche Bildung des Metaboliten könnte daher durch Bodenbakterien oder Pilze im Rhizosphärenbereich (durchwurzelter Bodenbereich) induziert worden sein. Mathews et al. konnten bereits bakterielle Abbauprodukte von Sulfonamiden nachweisen (Mathews and Reinhold, 2013). In weiteren Studien konnte die Aktivität von *N*-Acetyltransferasen in Pilzen nachgewiesen werden, die im Rhizosphärenbereich mit Leguminosen Symbiosen bildeten (Rodrigues-Lima et al., 2006). Ein möglicher anderer Ansatz für das Auffinden des Metaboliten im Grün des Weidelgrases und in den Wurzeln und Blättern der Möhren könnte hingegen auch auf eine Bildung in der Pflanze zurückzuführen sein. Der Hauptmetabolit im Tier ist die *N*-acetylierte Form der Sulfonamide. In Pflanzen wurde dieser Metabolit bislang noch nicht nachgewiesen. Studien mit Karottenzellkulturen zeigten jedoch, dass diese in der Lage sind u.a. Sulfamethoxazol zu metabolisieren (Wu et al., 2016). Es wurde festgestellt, dass Substanzen die Carboxylgruppen (z.B. Diclofenac, Ibuprofen), phenolische Hydroxylgruppen (z.B. Triclosan) oder *N*-Arylgruppen (z.B. Sulfamethazin, Sulfamethoxazol) enthielten, im Allgemeinen Substrate für den Metabolismus in der Karottenzelle waren. Über Studien mit Herbiziden konnte beispielsweise Chloramben, welches ebenfalls eine *N*-Arylamingruppe besitzt, im Phase II Metabolismus der Pflanze Zuckerkonjugate formen (Hall et al., 2000). Die tatsächlich aufgenommenen Antibiotikagehalte könnten unter Einbeziehung möglicher Metabolite der Sulfonamide deutlich höher sein. Dies müsste in weiterführenden Arbeiten, auch unter Feststellung der antibiotischen Wirksamkeit, näher untersucht werden. Das Transformationsprodukt (Epi)-iso-Chlortetracyclin war in den Möhrenwurzeln nachweisbar. Eine Verlagerung in andere Pflanzenteile konnte nicht beobachtet werden. Im Zuge der Güllefermentation und Lagerung wurde die Isoform gebildet. Es ist daher unklar, ob die nachgewiesenen Gehalte über das Gülle-Boden-

Gemisch der Pflanze zur Verfügung standen oder erst im Rhizosphärenbereich bzw. in der Pflanze gebildet wurden. Dies kann über Studien mit Hydrokulturen herausgefunden werden, deren Nährmedien lediglich Chlortetracyclin enthalten. In der Literatur wurden bislang Epimerisierungen als Abbaureaktionen von Tetracyclinen in Pflanzen genannt (Agwuh and MacGowan, 2006). Diese wurden mit der vorliegenden Methode erfasst und als Summenparameter aus dem Epimer und der Ursprungssubstanz ausgewertet. Eine Aussage darüber, ob die nachgewiesenen Transformationsprodukte der Tetracycline lediglich aus der Güllevorbehandlung stammten oder aus der Bildung in der Pflanze herrühren, lässt sich nicht klären und bedarf weiterer Forschungsarbeiten.

5.4.5 Risikobewertung einer möglichen menschlichen Exposition

Derzeit sind lediglich für Lebensmittel tierischen Ursprungs Rückstandshöchstmengen in Bezug auf pharmakologisch wirksame Stoffe über die Verordnung (EG) Nr. 470/2009 in Verbindung mit der Verordnung (EU) Nr. 37/2010 gesetzlich geregelt (VO (EG) Nr. 470/2009, 2009; VO (EU) Nr. 37/2010, 2010). Die festgelegten Rückstandshöchstmengen (**Maximum Residue Limit, MRL**) haben den Schutz des Verbrauchers vor gesundheitlich bedenklichen Wirkstoffrückständen in tierischen Lebensmitteln zum Ziel. Gesundheitlich unbedenkliche MRL-Werte werden bereits vor dem eigentlichen Zulassungsverfahren erhoben. Hierzu wird in Tierexperimenten der NOAEL-Wert (**No Observed Adverse Effect Level**) ermittelt. Dies ist die höchste Dosis eines Wirkstoffes, bei der bei dem empfindlichsten Organismus keine Wirkung auftritt. Durch Division des NOAEL durch einen Sicherheitsfaktor (in der Regel 100; berücksichtigt die Extrapolation vom Tier auf den Menschen und Variation innerhalb der Spezies Mensch), erhält man den ADI-Wert (**Acceptable Daily Intake**). Dieser gibt die Wirkstoffmenge in mg pro kg Körpergewicht an, die der Mensch täglich ein Leben lang aufnehmen kann, ohne dass damit ein nennenswertes Gesundheitsrisiko verbunden ist. Die MRL-Werte in den einzelnen tierischen Lebensmitteln wie z.B. Fleisch, Eier oder Milch werden so bestimmt, dass die Summe aller möglichen Rückstände in allen Bestandteilen der täglichen Nahrung sicher unter dem ADI liegt.

Der positive Nachweis von Rückstandskonzentrationen an Antibiotika in Deutschem Weidelgras und in den Möhren zeigt, dass Pflanzen prinzipiell in der Lage sind über Gülle in den Boden eingetragene Antibiotika aufzunehmen bzw. an deren Oberfläche zu adsorbieren. Ein Eintrag in die Nahrungskette des Menschen und von Weidetieren ist somit bestätigt. Da der Mensch kein Weidelgras als Nahrungsmittel aufnimmt, kann eine Risikoabschätzung nur unter der Annahme erfolgen, dass die Belastung von Weidelgras der von pflanzlichen Lebensmitteln (z.B. einer oberirdisch gewachsenen Nutzpflanzenart wie Kopfsalat) gleichgesetzt wird. Die Möhre zählt hingegen zu Wurzel- und Knollengemüse, die vom Menschen verzehrt werden. Die Pflanzen stehen in einem direkten Kontakt mit dem Gülle-Boden-Gemisch. Um das Risiko für den Menschen durch den Verzehr der in dieser Arbeit aufgezogenen Pflanzen abschätzen zu können, wurde der ADI-Wert herangezogen. Der ADI-Wert für Sulfamethazin liegt bei

50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ KG/Tag (JECFA, 1995). Der Mittelwert der am höchsten mit Sulfamethazin belasteten Weidelgrasprobe lag bei 24,9 $\mu\text{g kg}_{\text{FM}}^{-1}$. Ein Mensch von 60 kg müsste gemäß dieser Modellrechnung pro Tag 120,5 kg belastete Lebensmittel verzehren, um den ADI auszuschöpfen. Der durchschnittliche tägliche Verzehr pflanzlicher Lebensmittel in Deutschland wird gemäß der Nationalen Verzehrsstudie II mit 621 g angegeben (Max Rubner-Institut, 2013). Berechnet wurde dieser Wert aus der mittleren Verzehrsmenge von „Pflanzliche Fette und Öle“, „Obst und Obsterzeugnisse“, „Nüsse und Samen“, „Gemüse, Pilze und Hülsenfrüchte“, „Kartoffeln und Kartoffelerzeugnisse“, „Brot“, „Backwaren“ und „Getreide und Getreideerzeugnisse“ für Männer und Frauen. Unter der Annahme eines täglichen Verzehrs von 621 g pflanzlicher Lebensmittel, deren Sulfamethazingehalt 24,9 $\mu\text{g kg}_{\text{FM}}^{-1}$ beträgt, würde eine Person mit einem Körpergewicht von 60 kg ihren ADI zu 0,5 % ausschöpfen. Bei der Möhre wurden die höchsten Antibiotikarückstände in den Wurzeln und in dem Möhrengrün nachgewiesen. Zur Beurteilung eines Verbraucherrisikos wird in der vorliegenden Arbeit lediglich der verzehrfähige Rübenkörper betrachtet. In diesem konnten Maximalgehalte von 1,7 $\mu\text{g kg}_{\text{FM}}^{-1}$ Sulfamethazin, 3,3 $\mu\text{g kg}_{\text{FM}}^{-1}$ Sulfamethoxazol und 1,6 $\mu\text{g kg}_{\text{FM}}^{-1}$ Doxycyclin nachgewiesen werden. Der ADI-Wert für Doxycyclin liegt bei 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ KG/Tag (EMA, 1997). Für Sulfamethoxazol liegt der ADI Wert bei 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ KG/Tag (Chitescu et al., 2013). Bei einem täglichen Verzehr von 621 g der maximal belasteten Möhren würde eine 60 kg schwere Person den ADI für Sulfamethazin zu 0,04 %, den ADI für Sulfamethoxazol zu 0,02 % und den ADI für Doxycyclin zu 0,6 % ausschöpfen.

Auf Grundlage der vorgenommenen Risikoabschätzung und unter Einbeziehung der therapeutischen Tagesdosen von Antibiotika, welche bei 20 – 200 mg liegen (INESSS, 2009), ist durch den Verzehr der untersuchten Weidelgras- und Möhren-Proben nicht von einer Gesundheitsgefährdung des Verbrauchers auszugehen. Nimmt man zudem eine Beurteilung der Ergebnisse auf Grundlage der für tierische Lebensmittel festgelegten MRL Werte vor, so sind auch hier keine Überschreitungen zu verzeichnen. Der „schärfste“ MRL-Wert liegt für die Summe der Sulfonamide bei 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Der durchschnittliche tägliche Verzehr tierischer Lebensmittel in Deutschland liegt gemäß der Nationalen Verzehrsstudie II bei 350,5 g. Der Gehalt berechnet sich aus der mittleren Verzehrsmenge von „Fleisch, Fleischerzeugnisse und Wurstwaren“, „Fisch, Fischerzeugnisse, Krusten und Schalentiere“, „Eier“, „Milch und Milcherzeugnisse, Käse und Quark“, „tierische Fette“ für Männer und Frauen. Da der Mensch laut Nationaler Verzehrsstudie II knapp doppelt so viele pflanzliche wie tierische Lebensmittel verzehrt, müsste man für die Beurteilung eines Risikos den MRL-Wert für Pflanzen auf 56,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ herabsetzen. Dieser Gehalt wird weder von den Weidelgras- noch von den verzehrfähigen Möhrenproben überschritten.

Für Antibiotika wird neben dem toxikologisch ermittelten ADI-Wert ein mikrobiologischer ADI-Wert bestimmt, welcher in der Regel deutlich unter einem toxikologisch ermittelten liegt. Für die Bestimmung des mikrobiologischen ADI-Wertes werden Tests mit typischen Darmbewohnern des Menschen durchgeführt. In diesem Zusammenhang werden auch Resistenztests

vorgenommen (EMA, 2012). Gemäß einer Stellungnahme des BfR ist das Risiko einer Resistenzentwicklung bei menschlichen Darmbakterien als gering einzuschätzen, wenn die über pflanzliche Lebensmittel aufgenommenen Antibiotikamengen unterhalb des ADI-Wertes liegen und die Exposition über einen kurzen Zeitraum erfolgt (BfR, 2010).

Für Möhren kann anhand der Ergebnisse eine allgemeine Verzehrsempfehlung ausgesprochen werden. So sollten die Wurzeln und das Grün abgetrennt, sowie der Rübenkörper abgeschält und anschließend abgewaschen werden. Hierdurch können Lebensmittelkontaminationen durch lediglich äußerlich anhaftender Antibiotika vermieden bzw. auf ein geringes Risiko minimiert werden. Ferner liegen bislang wenige Daten zu Veränderungen der Antibiotikazusammensetzung durch Kochen oder anderweitige Weiterverarbeitung des Gemüses vor.

Ein indirekter Eintrag von Antibiotika aus Weidelgras in die menschliche Nahrungskette wäre denkbar, wenn Weidevieh das kontaminierte Gras aufnimmt und es über diesen Weg zu einer Akkumulation im Tier kommt. Unter der Annahme, dass Weidevieh 50 kg des maximalbelasteten Grases pro Tag frisst, entspräche dies einer absoluten Sulfamethazin-Aufnahme von 1.245 µg. Zum Vergleich erhalten erkrankte Tiere Sulfamethazin-Präparate mit Wirkstoffdosierungen von 100 – 200 mg Sulfamethazin pro kg KG und Tag. Die Therapiedauer erfolgt meist über einen Zeitraum von 5 – 7 Tagen. Die über das Futter aufgenommenen Wirkstoffkonzentrationen sind somit vernachlässigbar gering.

5.5 Antibiotikarückstände im Wasser

Über durchgeführte Lysimeterstudien im Labormaßstab sollte eine mögliche Verfrachtung ausgewählter Tetracycline und Sulfonamide mit dem Bodensickerwasser untersucht werden. Die erhobenen Daten sollten für eine Abschätzung einer möglichen Grundwasserbelastung herangezogen werden. Parallel zu dieser Versuchsstudie wurden im Auftrag des HLNUG hessische Grundwasserproben auf Antibiotikarückstände untersucht.

5.5.1 Nachweis der Antibiotika in Bodeneluatn der Lysimeterstudie

Anhand von Lysimeterstudien im Labormaßstab kann die Verfrachtung von Wirkstoffen mit dem Sickerwasser beobachtet werden. Eine Einschätzung bezüglich einer Oberflächenauswaschung (run-off-Prozesse), wie sie durchaus auf meist frisch gedüngten Ackerflächen nach starken Regengüssen stattfinden können (Bailey et al., 2015; Burkhardt et al., 2005; Davis et al., 2006; Kay et al., 2005), wird nicht betrachtet. Für die durchgeführten Lysimeterstudien wurden zwei verschiedene Bodenarten (Volkmarser Sand, Baunataler Löß) gewählt. Die Antibiotikaufgabe erfolgte oberflächlich über fermentierte Rindergülle in drei verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen (20, 50, 100 mg kg⁻¹). Die Rohre wurden an 5 Tagen pro Woche mit je 10 ml deionisiertem Wasser bewässert. Die Bodeneluate wurden aufgefangen und monatlich auf Antibiotikarückstände analysiert. Unter diesen gewählten Versuchsbedingungen war über einen Versuchszeitraum von zwei Jahren lediglich Sulfamethazin in den Bodeneluatn nachweisbar. Die höchsten Wirkstoffkonzentrationen konnten in Lysimetereluatn von Sandböden detektiert

werden. Die Wirkstofffrachten lagen unter 1 % der ursprünglich über Gülle eingetragenen Wirkstoffkonzentration (**Tabelle 4-19**). Die anderen drei Wirkstoffe ((Epi)-Chlortetracyclin, (Epi)-Doxycyclin und Sulfamethoxazol) konnten nicht in den Bodeneluaten wiedergefunden werden. Verwunderlich erscheinen die Diskrepanzen zwischen dem Auswaschungsverhalten von Sulfamethazin und Sulfamethoxazol, da sie aus der gleichen Wirkstoffgruppe stammen und gemäß Kurwadkar et al. ähnliche Mobilitäten im Boden zeigen. Auch im Vergleich zu anderen Sulfonamiden (Sulfapyridin, Sulfadimethoxin oder Sulfachlorpyridazin) konnten die Autoren für Sulfamethazin und Sulfamethoxazol ein schnelleres Durchbruchverhalten belegen (Kurwadkar et al., 2011). Diese Feststellung wurde ebenfalls einige Jahre später durch Untersuchungen von Spielmeyer et al. bestätigt (Spielmeyer et al., 2017a). In der vorliegenden Arbeit konnten die wirkstoffspezifischen Unterschiede im Auswaschungsverhalten der beiden Sulfonamide auf deren unterschiedlichem Verhalten während der fermentativen GÜllevorbehandlung zurückgeführt werden (siehe **Kapitel 5.2** und dort aufgeführte Literatur). Anhand der analysierten GÜlleproben zeigte sich eine schnelle Eliminierung des Sulfamethoxazols innerhalb der ersten Fermentationswoche (**Abbildung 4-20**). In den Lysimeterböden und den Bodeneluaten wurden Negativbefunde in Bezug auf Sulfamethoxazol erhalten (**Abbildung 5-9**). Die Daten dieser Arbeit und anderer Studien zeigen, dass durch eine geeignete GÜllevorbehandlung zumindest die Ursprungssubstanz Sulfamethoxazol eliminiert werden kann und dieser Wirkstoff nicht über die Anwendung von GÜlle als Wirtschaftsdünger in den Boden eingetragen und von dort aus weiter in Richtung Grundwasser verfrachtet wird (Mohring et al., 2009; Spielmeyer et al., 2017b). Der Metabolit *N*-Acetyl-Sulfamethoxazol war ebenfalls nicht nachweisbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bildung weiterer möglicher Abbauprodukte des Sulfamethoxazols nicht untersucht. Andere Arbeiten beschäftigten sich im Speziellen mit der Entstehung von Abbauprodukten im Fermentationsprozess. Hierbei konnten Spielmeyer et al. bereits Abbauprodukte des Sulfamethoxazols identifizieren, die polarer sind als die Ausgangssubstanzen und somit eine höhere Bioverfügbarkeit im Boden besitzen. Meist weisen die Abbauprodukte jedoch eine verminderte antimikrobielle Aktivität auf (Spielmeyer et al., 2017b). Sulfamethazin wurde im Rahmen der Fermentation nicht vollständig eliminiert (**Abbildung 4-20**) und folglich über die GÜlleanwendung auf den Lysimeterboden aufgegeben. Aufgrund ihrer geringen Sorptionsneigung an Bodenbestandteile, können Sulfonamide als mobile Substanzen eingestuft werden (Thiele-Bruhn, 2003). Die im Rahmen anderer Studien ermittelten Sorptionskoeffizienten (K_d -Werte) sind gering und liegen im ein- bis zweistelligen Bereich (**Tabelle 1-2**). In den Pflanzen der Aufwuchsstudien wurde ebenfalls Sulfamethazin bis in die grünen, oberirdisch gewachsenen Pflanzenteile nachgewiesen, was zudem für dessen Bioverfügbarkeit im Bodenporenwasser spricht. Die schichtweise Bodenanalyse der Lysimeter zeigte, dass nach 2,5 Jahren lediglich 0,1 – 0,2 % des anfangs aufgebrauchten Sulfamethazingehaltes im Lysimeterboden nachweisbar war. Der Großteil dieser extrahierbaren Rückstände zeigte eine Persistenz in den oberen 5 cm. Gründe für dieses Verhalten, wie die Bildung nicht-extrahierbarer, gebundener Rückstände, sowie Sequestrierung und mikrobieller Abbau, wurden in **Kapitel 5.3** diskutiert und mit Literaturdaten verglichen. Obwohl lediglich 4,8 bis 9,1 $\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ Sulfamethazin im Oberboden (0 – 15 cm) nachweisbar war, wurden Wirkstoffkonzentrationen im Bodeneluat nachgewiesen.

Auch andere Studien decken sich mit diesen Erkenntnissen. So beobachteten Hamscher et al., dass trotz einer niedrigen Sulfamethazinkonzentration im Oberboden von im Mittel $< 1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ein kontinuierlicher Eintrag des Wirkstoffes in oberflächennahes Grundwasser (1,40 m) in Konzentrationen bis $0,24 \mu\text{g L}^{-1}$ erfolgte (Hamscher et al., 2005a). Studien von Spielmeyer et al. konnten eine Auswaschung dieses Wirkstoffes selbst vier Jahre nach der letzten Gülleaufgabe beobachten (Spielmeyer et al., 2017a).

Wie bereits erwähnt, wurden abhängig vom Bodentyp unterschiedliche Sulfamethazinkonzentrationen in den Bodeneluat nachgewiesen. In Eluat von Sandböden waren die Wirkstofffrachten mit $0,05 - 0,09 \%$ deutlich höher als in Eluat von Lössböden ($0,02 - 0,04 \%$). In **Kapitel 5.3** wurde der Zusammenhang zwischen den chemischen Eigenschaften der Wirkstoffe und den physikalisch-chemischen Bodeneigenschaften (z.B. Bodengefüge, pH-Wert, organischer Kohlenstoffgehalt, Kationengehalt, Feuchtigkeitsgehalt) für die Verlagerung der Wirkstoffe mit dem Sickerwasser betrachtet. Insbesondere die Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Bodentypen sowie die damit verbundenen Auswirkungen auf das Sorptionsverhalten der Wirkstoffe wurden herausgestellt und mit Literaturdaten verglichen. In aktuellen Studien von Pan et al. konnten ebenfalls höhere Antibiotikaverfrachtungen in Sandböden statt Ton- oder Lössböden festgestellt werden. Die Ergebnisse der genannten Autoren stehen im Einklang mit den Erkenntnissen dieser Arbeit (Pan and Chu, 2017b). Kurwadkar et al. untersuchten ähnlich wie in dieser Lysimeterstudie Unterschiede im Leaching-Verhalten ausgewählter Sulfonamide in lehmigem Sandboden und sandigem Lehmboden (Kurwadkar et al., 2011). Die Autoren zeigten, dass lediglich in Eluat des Sandbodens Wirkstoffrückstände nachweisbar waren. Die vollständige Eliminierung der Wirkstoffe im Lehmboden der Studien von Kurwadkar konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Die Sorptionseigenschaften an den Boden werden stark von dessen pH-Wert beeinflusst (Thiele-Bruhn et al., 2004). Unter Einbeziehung der pK_a Werte, liegt Sulfamethazin in den verwendeten Böden in seiner neutralen und anionischen Form vor. In der Literatur konnte bereits eine höhere Mobilität der Anionenform beobachtet werden (Kurwadkar et al., 2011). Die Anwendung von Gülle (leicht basisch) führt ebenfalls zu einer leichten pH-Wert-Verschiebung in den basischen Bereich. Auf der anderen Seite werden durch die Gülle auch organische Bestandteile in den Boden eingetragen, welche wiederum die Sorption der Wirkstoffe begünstigen können. Bei einer rein oberflächlichen Gülleausbringung kann dies zu einer Adsorption der Wirkstoffe in der obersten Bodenschicht oder der Gülle führen und eine Verlagerung in tiefere Bodenschichten wird erschwert. Dies deckt sich mit den Befunden in den Lysimeterböden. Hier waren die höchsten Wirkstoffkonzentrationen in der ersten Bodenschicht nachweisbar (**Abbildung 5-9**). Neben den genannten Parametern wie pH-Wert und Interaktionen zwischen organischen Bodenbestandteilen und den Wirkstoffen (z.B. über Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Kräfte, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, hydrophobe Bindungen, kovalente Bindungen, Ionenaustausch, Komplezierungen) nehmen auch biotische (mikrobieller Abbau) und weitere abiotische Faktoren (Temperatur, Niederschlagsmenge, Durchwurzelung des Bodens, Makroporen, Zeit der Gülleapplikation) einen Einfluss auf die Wirkstoffkonzentrationen im

Boden und deren Translokation (vgl. **Kapitel 5.3**). Die Verweilzeit der Wirkstoffe im Boden hat ebenfalls eine Auswirkung auf deren Bioverfügbarkeit (Kahle and Stamm, 2007a, 2007b). Bei einem Datenvergleich müssen daher alle möglichen Faktoren, die wie oben erwähnt eine Beeinflussung der Sorptionseigenschaften bzw. Eliminierung der Wirkstoffe implizieren, betrachtet werden. Aufgrund der Komplexität dieser Interaktionen erweist sich ein Vergleich und das Herausstellen dominierender Einflussfaktoren als äußerst schwierig.

Tetracycline werden in der Veterinärmedizin häufig an Tierärzte abgegeben (**Abbildung 1-1**). Dennoch ist das Auffinden dieser Wirkstoffgruppe in wässrigen Umweltmatrices eher selten (López-Serna et al., 2013), begründet durch deren gute Sorptionseigenschaften an Partikel (Tonminerale, organische Bestandteile) im Oberboden. Daher wird diese Wirkstoffklasse als immobil eingestuft. Die Untersuchung der Lysimeterböden zeigte, dass die beiden Tetracycline (Epi)-Chlortetracyclin und (Epi)-Doxycyclin ausschließlich in der ersten Bodenschicht (0 – 5 cm) quantitativ bestimmt werden konnten und dort über mehrere Jahre (Untersuchungszeitraum: 2,5 Jahre) persistierten. Diese Feststellung deckt sich mit anderen Literaturdaten und ist in **Kapitel 5.3** diskutiert worden. In den Lysimetereluaten waren keine Tetracycline oberhalb der Bestimmungsgrenze von 1 ng L^{-1} nachweisbar. Eine Verlagerung in tiefere Bodenschichten und eine Kontamination des Grundwassers kann anhand der erhaltenen Ergebnisse aus dem Lysimeterversuch als gering eingestuft werden. Da es sich hierbei allerdings um einen Modellversuch im Labormaßstab über einen begrenzten Zeitraum handelte und die Gülleausbringung lediglich oberflächlich und einmalig erfolgte, ist eine Grundwasserkontamination mit Tetracyclinen nicht komplett auszuschließen. Aufgrund der Persistenz und Anreicherung im Oberboden könnten durch häufigere Antibiotikaeinträge und niedrige Umgebungstemperaturen die Konzentrationen steigen (Hamscher et al., 2002; Jacobsen and Berglind, 1988). Desorptionsprozesse aufgrund von Bodenerosionen könnten im Laufe der Jahre zu einer Freisetzung der gebundenen oder sequestrierten Wirkstoffe führen. Dadurch wird deren Bioverfügbarkeit erhöht und Verlagerungen der Wirkstoffe in tiefere Bodenschichten sind denkbar. In der Literatur wurde von ähnlichen Lysimeterstudien berichtet. Auch dort konnten keine Tetracycline in den Lysimetereluaten nachgewiesen werden (Blackwell et al., 2009).

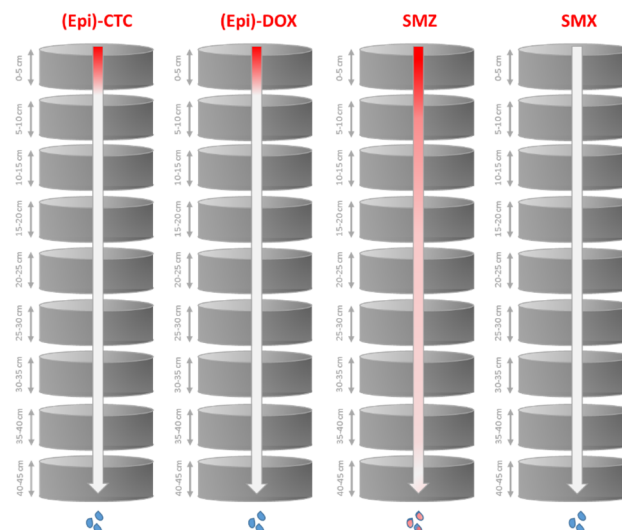


Abbildung 5-9: Lysimeterstudie: Visuelle Übersicht der Wirkstofffrachten in die Bodeneluatate.

5.5.2 Nachweis von Antibiotikarückständen in hessischen Grundwasserproben

Gemäß der Richtlinie 2000/60/EG ist Grundwasser definiert als „alles unterirdische Wasser in der Sättigungszone, das in unmittelbarer Berührung mit dem Boden oder dem Untergrund steht“ (Richtlinie 2000/60/EG, 2000). In vielen Regionen ist Grundwasser die Hauptquelle für die öffentliche Trinkwasserversorgung. Daher wird über chemische Analysen die Grundwasserbeschaffenheit überprüft, um Risiken für die menschliche Gesundheit und die Umwelt durch Schadstoffe zu vermeiden. Gemäß der Richtlinie 2000/60/EG Anhang V Punkt 2.4.3 werden die Grundwassermessstellen mindestens einmal im Jahr beprobt. Antibiotika können sowohl aus der Human- als auch aus der Veterinärmedizin in das Grundwasser eingetragen werden. Antibiotika aus der Humanmedizin können über menschliche Ausscheidungen, unsachgemäße Entsorgung, sowie über Klinikabwässer und produktionsbedingte Einleitungen in das Abwasser gelangen. In der Kläranlage nicht zurückgehaltene Antibiotika können über das geklärte Abwasser in Oberflächengewässer eingetragen werden. Sulfamethoxazol zählt zu den am häufigsten in Abwässern von kommunalen Kläranlagen detektierten Antibiotika (Batt and Aga, 2005). Durch die Verwendung von Klärschlamm als Düngemittel können Humanpharmaka zudem auf landwirtschaftliche Nutzflächen gelangen. Norwegischen Studien zur Folge konnten in den Klärschlämmen hohe Konzentrationen an Tetracyclinen wie Doxycyclin und Chlortetracyclin nachgewiesen werden (Clara et al., 2010). In der Veterinärmedizin verabreichte Antibiotika werden zu 30 – 90 % unverändert mit dem Urin und Fäzes ausgeschieden (Sarmah et al., 2006). Werden Ausscheidungen von Nutztieren als Wirtschaftsdünger verwendet, können die Wirkstoffe in den Boden eingetragen werden und über den Weg der Infiltration in das Grundwasser gelangen. Antibiotika, die über eine oberflächliche Gülleanwendung ohne spätere Einarbeitung in die Ackerkrume in den Boden eingetragen werden, können bei starken Regengüssen (meist unmittelbar nach der Gülleausgabe) einer Abdrift (run-off) in nahegelegene Oberflächengewässer unterliegen (Kreuzig and Höltge, 2005) und in weiterer Folge ins Grundwasser gelangen. Es existieren bereits Beschränkungen für die Düngung, um den Transport von Düngemitteln auf dem Landweg zu verhindern. Zum Beispiel sollte die Anwendung nicht im Winter oder direkt vor einem starken Regen stattfinden (Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen, 2012). Gleiches gilt für die Verwendung von Klärschlämmen als Düngemittel. In Oberflächengewässern sind die nachgewiesenen Konzentrationen und die Nachweishäufigkeiten an Antibiotika höher im Vergleich zu Grundwasserproben (Frimmel and Müller, 2006). In den letzten Jahren konnten mehr als 30 verschiedene Antibiotika in Zu- und Abläufen von Kläranlagen, Oberflächengewässern, Grundwässern und sogar im Trinkwasser nachgewiesen werden (Kemper, 2008). Sulfonamide gelten weltweit als die am häufigsten im Grundwasser detektierten Wirkstoffe (Hannappel et al., 2014). **Tabelle C-10** gibt eine Übersicht über bislang in verschiedenen Wässern detektierte Antibiotika aus den beiden Wirkstoffgruppen der Tetracycline und Sulfonamide unter Angabe der Maximalkonzentrationen.

Gemäß den Ausführungen in **Kapitel 5.3** ist von Tetracyclinen ein geringes Risiko der Auswaschung anzunehmen. Die Substanzen waren lediglich im Oberboden der Lysimeterrohre nachweisbar (**Abbildung 5-9**). Auch in den Bodeneluatn konnten keine Tetracycline nachgewiesen

werden. Dennoch wurden in dieser Arbeit vereinzelt in hessischen Grundwasserproben Chlortetracyclinbefunde oberhalb der Bestimmungsgrenze von 50 ng L^{-1} detektiert.

Antibiotika aus der Wirkstoffgruppe der Sulfonamide stellen hingegen sehr mobile Substanzen dar. Sie besitzen niedrige Sorptionskoeffizienten (**Tabelle 1-2**). Der Wirkstoff Sulfamethazin war sowohl in den Lysimeterböden, als auch in den Bodeneluaten quantifizierbar. Durch Infiltrationsprozesse kann ein Eintrag bis ins Grundwasser nach den Erkenntnissen der durchgeführten Lysimeterstudien nicht ausgeschlossen werden. Durch die Analyse der Grundwasserproben bestätigten sich diese Einschätzungen. Der Großteil der positiven Proben wies Sulfonamidrückstände auf. Bislang publizierte Daten zu Grundwasser-Monitoringstudien decken sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit. In Grundwasserproben konnten bislang keine Tetracycline (Christian et al., 2003; Hirsch et al., 1999; Lindsey et al., 2001; López-Serna et al., 2013; Meyer et al., 2000; Zhu et al., 2001) oder nur sehr geringe Konzentrationen nachgewiesen werden (Kolpin et al., 2002). So wurde eine Verlagerung der Tetracycline bis in das Grundwasser trotz der starken Sorption im Oberboden beobachtet. Messstellen in Gebieten mit sandigem Boden wiesen Konzentrationen von $0,05$ bis $0,14 \mu\text{g L}^{-1}$ auf (Pawelzick, 2005). Die Nachweishäufigkeit und Konzentrationen nehmen jedoch in Proben aus Oberflächengewässern zu. Dort werden Tetracycline im unteren $\mu\text{g kg}^{-1}$ -Bereich nachgewiesen. So detektierten Lindsey et al. in 9 von 138 Proben aus Oberflächengewässern Tetracycline, darunter $0,11 \mu\text{g L}^{-1}$ Chlortetracyclin. In der entsprechenden Literatur wurde dies durch Oberflächenauswaschungen begründet (Lindsey et al., 2001). Aus der Wirkstoffgruppe der Sulfonamide konnten Hirsch et al. in zwei von 69 Grundwasserproben $0,16 \mu\text{g L}^{-1}$ Sulfamethazin nachweisen. Tetracycline waren nicht nachweisbar (Hirsch et al., 1999). Auch andere Monitoring-Studien aus Nordrhein-Westfalen konnten lediglich Sulfonamide (Sulfamethazin und Sulfamethoxazol) in Grundwasserproben nachweisen. Sulfamethoxazol wurde in einer Maximalkonzentration von 950 ng L^{-1} detektiert. Die Konzentrationen an Sulfamethazin waren hingegen in einem sehr niedrigen Bereich von $\leq 11 \text{ ng L}^{-1}$ (Hannappel et al., 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 687 hessische Grundwasserproben im Auftrag des HLNUG auf ausgewählte Sulfonamid- und Tetracyclinrückstände analysiert. Rund 96 % der Proben wiesen keine Antibiotikarückstände oberhalb der vom Auftraggeber geforderten Bestimmungsgrenze von 50 ng L^{-1} auf. Der Großteil der positiven Proben enthielt den Wirkstoff Sulfamethoxazol. Auch in Grundwässern aus Spanien wurde Sulfamethoxazol am häufigsten detektiert (García-Galán et al., 2011). In Deutschland wurden bereits Monitoringstudien in Norddeutschland durchgeführt. Auch hier konnten Sulfonamide am häufigsten nachgewiesen werden (Hannappel et al., 2016; Hannappel et al., 2014). Für die Diskussion wurden 11 höher belastete Messstellen genauer betrachtet, um mögliche Eintragsquellen ausfindig zu machen. Diese ausgewählten Messstellen sind in der Hessenkarte (**Abbildung 5-10**) eingezeichnet.

Tabelle 5-3 fasst zudem die jeweiligen hydrogeologischen Daten zu den Messstellen zusammen. Die genauen Lagen der Messstellen wurden über das „Fachinformationssystem Grund- und Trinkwasserschutz Hessen (GruSchu)“ des HLNUG ermittelt und die nähere Umgebung

auf mögliche Antibiotika-Eintragsquellen betrachtet (GruSchu Hessen). Einträge über kommunale Kläranlagen, Biogasanlagen und die Abschwemmung bzw. Infiltration von landwirtschaftlichen Ackerflächen standen im Fokus.

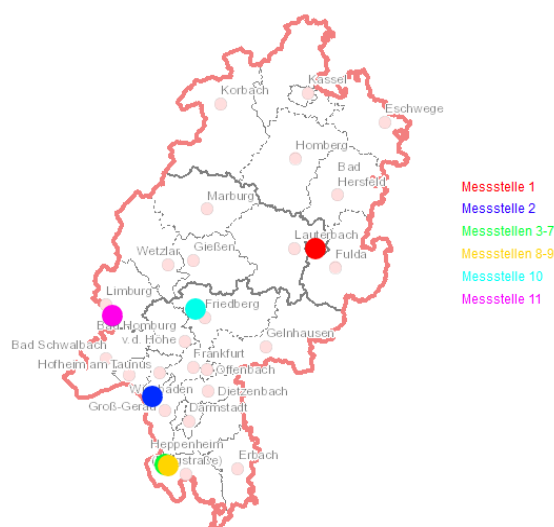


Abbildung 5-10: Hessenkarte und markierte Messstellen mit hohen Antibiotikabefunden.

Tabelle 5-3: Hydrogeologische Daten der Messstellen. Daten entnommen aus GruSchu.

Hydrogeologische Daten	Messstelle 1	Messstelle 2; 3-7 und 8-9	Messstelle 10	Messstelle 11
Hydrogeologische Einheiten	Mittlerer Buntsandstein	Terassenkiese und -sande	Unterdevonische Ton-schiefer und Sandsteine	Quartäre feinkörnige Flusssedimente
Gesteinsart	Sediment	Sediment	Sediment	Sediment
Verfestigung	Festgestein	Lockergestein	Festgestein	Lockergestein
Hohlraumart	Kluft	Poren	Kluft	Poren
Geochemischer Gesteinstyp	silikatisch	silikatisch/karbonatisch	silikatisch	silikatisch
Durchlässigkeit	mäßig – gering	mittel	gering – äußerst gering	mäßig – gering
Leitercharakter	Grundwasser-Leiter	Grundwasser-Leiter	Grundwasser/Gering-leiter	Grundwasser-Leiter/Geringleiter

Im Rahmen der Grundwasseruntersuchungen (**Abbildung 4-41**, **Abbildung 4-42**, **Tabelle 4-21**, **Tabelle 4-22**) konnte der Wirkstoff Sulfamethoxazol am häufigsten detektiert werden, was hauptsächlich auf dessen Einsatz in der Humanmedizin und den Eintrag über die Kläranlagen zurückgeführt wurde. Im Jahr 2016 lag der ermittelte Medianwert für Sulfamethoxazol bei 85 ng L^{-1} , im Jahr 2017 bei $62,5 \text{ ng L}^{-1}$. In einer Probe konnte ein Maximalwert von 1.703 ng L^{-1} nachgewiesen werden, welcher die PEC für Grundwasser von $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ überschreitet. Die Probe enthielt neben dem hohen Gehalt an Sulfamethoxazol auch dessen Metaboliten *N*-Acetyl-Sulfamethoxazol in einer Konzentration von $113,8 \text{ ng L}^{-1}$. Gemäß der “Guideline on environmental impact assessment for veterinary medicinal products in support of the VICH

guidelines GL6 and GL38” (EMA, 2016) müssen neu zugelassene Wirkstoffe einer umfangreichen ökotoxikologischen Risikobewertung unterzogen werden, wenn im Grundwasser der PEC von $1 \mu\text{g L}^{-1}$ überschritten wurde. Daher sollte das ökotoxikologische Risiko dieses Altwirkstoffes, welcher vor diesen Regelungen auf den Markt gekommen ist, überprüft werden.

Die Grundwassermessstelle mit diesem hohen Sulfamethoxazolbefund liegt in einem Waldgebiet in Osthessen (**Abbildung 5-11**). In etwa 500 m Entfernung befinden sich zahlreiche landwirtschaftliche Nutzflächen. 100 m von der Messstelle entfernt fließt ein Bach welcher in die Fulda mündet. Die Fulda verläuft etwa 2 km weiter östlich und in Richtung Westen fließt die Schlitz in etwa 3,5 km Entfernung. Die Lage der Messstelle könnte für einen Eintrag des Wirkstoffes über Wirtschaftsdünger sprechen. Sulfamethoxazol und dessen acetylierter Metabolit könnten über die Gülle in den landwirtschaftlich genutzten Boden eingetragen worden sein. Über direkte Infiltration in den Boden oder Oberflächenabdrift in nahegelegene Oberflächengewässer könnte ein Eintrag des Wirkstoffes in das Grundwasser stattgefunden haben. Ferner schließen die hohen Gehalte des acetylierten Metaboliten auch eine direkte Kontamination des Bodens durch Ausscheidungen von Weidevieh nicht aus. Wie in **Kapitel 5.2** bereits beschrieben, konnte in der vorliegenden Arbeit und auch in Studien anderer Wissenschaftler eine schnelle Eliminierung des Sulfamethoxazols während der Güllevorbehandlung beobachtet werden. Die hohen Gehalte des Metaboliten würden in diesem Falle für eine kurze Güllelagerung sprechen. Auf der anderen Seite wird Sulfamethoxazol hauptsächlich in der Humanmedizin eingesetzt, was auch den Eintragungspfad durch Abwasser aus häuslichen Kleinkläranlagen nicht ausschließt. Boden- und/oder Gülleuntersuchungen und Rücksprachen mit Landwirten aus der Region zum Einsatz von Antibiotika könnten hier weiteren Aufschluss zur genauen Eintragsquelle geben.

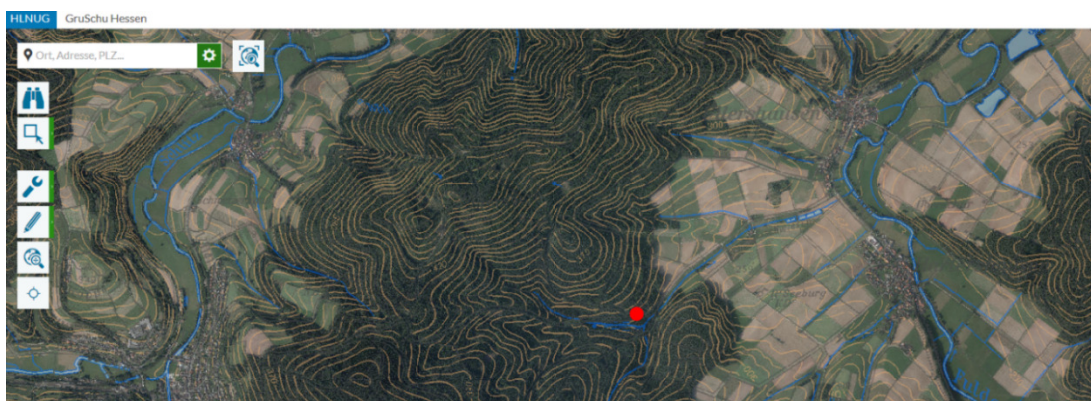


Abbildung 5-11: Hydrogeologische Lage der Messstelle 1. Daten entnommen aus GruSchu.

Die in **Abbildung 5-12** dargestellte Messstelle liegt im Ballungsraum Rhein-Main und grenzt an ein Siedlungsgebiet. In der Nähe befinden sich zudem die beiden Flüsse Rhein und Main. Im Jahr 2016 wurden 693 ng L^{-1} und im Jahr 2017 wurden 117 ng L^{-1} Sulfamethoxazol in Grundwasserproben dieser Messstelle nachgewiesen. Sulfamethoxazol wird hauptsächlich in der Humanmedizin verabreicht. Der Eintrag des Wirkstoffes über Siedlungsabströme wird da-

her als Haupteintragsquelle vermutet. An die höhere Bevölkerungsdichte im Rhein-Main Ballungsraum sind auch steigende häusliche Abwässer geknüpft. Als Indikatorparameter für einen Einfluss von Abwässern gelten u.a. das aus Waschmitteln stammende Bor und EDTA oder Süßstoffe aus der Anwendung in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie (Rückert, 2016). Hohe Chloridgehalte können ein Anzeichen für Salzlagerstätten im Untergrund sein oder durch Düngemittel, Streusalz und Abwasser in Grundwässer eingetragen werden. In der vorliegenden Grundwasserprobe waren die Bor- und EDTA-Gehalte unauffällig. Der Chloridgehalt war hingegen erhöht und auch der Süßstoff Acesulfam-K war mit einer Konzentration von 179 ng L^{-1} in der Grundwasserprobe nachweisbar. Weiterführende Parameter, die für einen Eintrag aus der Veterinärmedizin sprechen würden (Ammonium, Nitrat, Kalium, ortho-Phosphat), konnten in den Grundwasserproben dieser Messstelle nicht oder nur in geringen Mengen nachgewiesen werden, was den Eintrag über Human-Abwässer untermauert. Pflanzenschutzmittel waren ebenfalls nicht nachweisbar. Auch dies spricht gegen einen landwirtschaftlichen Eintrag.



Abbildung 5-12: Hydrogeologische Lage der Messstelle 2. Daten entnommen aus GruSchu.

Positive Sulfamethoxazolbefunde waren sowohl in dem Jahr 2016 als auch wiederholt im Jahr 2017 in Grundwasserproben von Messstellen der Gemeinde Biblis nachweisbar. Die Gehalte betragen 31 bis 139 ng L^{-1} mit einem Medianwert von 65 ng L^{-1} . Alle sieben beprobten Messstellen (**Abbildung 5-13**) befinden sich in unmittelbarer Nähe zur Weschnitz (50 m). Der hessische Riedsee ist 4 – 5 km von den Messstellen entfernt. Landwirtschaftliche Nutzflächen prägen das direkte Umfeld. Das umgebende Gebiet ist in der hydrogeologischen Übersichtskarte als Grundwasserleiter mit mittlerer Durchlässigkeit charakterisiert. Eine Kläranlage befindet sich nahe der Weschnitz und liegt flussaufwärts zu den betrachteten Messstellen am Rande eines Siedlungsgebietes (in 1 bis 2,9 km Entfernung). Als Eintragsquellen für Antibiotika werden sowohl Siedlungsabströme, als auch Einträge über Wirtschaftsdünger vermutet. Die Einleitung von Abwasser aus der nahegelegenen Kläranlage in die Weschnitz und Infiltration sowie Oberflächenabdrift von landwirtschaftlichen Nutzflächen kommen aufgrund der Lage als Eintragswege in Betracht. In die Weschnitz ausgeschwemmte Substanzen, können weiter abtransportiert oder in den Sedimenten abgelagert werden. Auch ein Eintrag aufgrund der Verwendung von Klärschlämmen als Düngemittel ist in Ballungsgebieten denkbar. Andere Arz-

neimittel, sowie Süßstoffe und Pflanzenschutzmittel waren in Grundwasserproben dieser Messstellen ebenfalls nachweisbar. Dies untermauert eine Doppelbelastung aus humanen Abwässern, Klärschlammdeponierungen und Wirtschaftsdüngern.

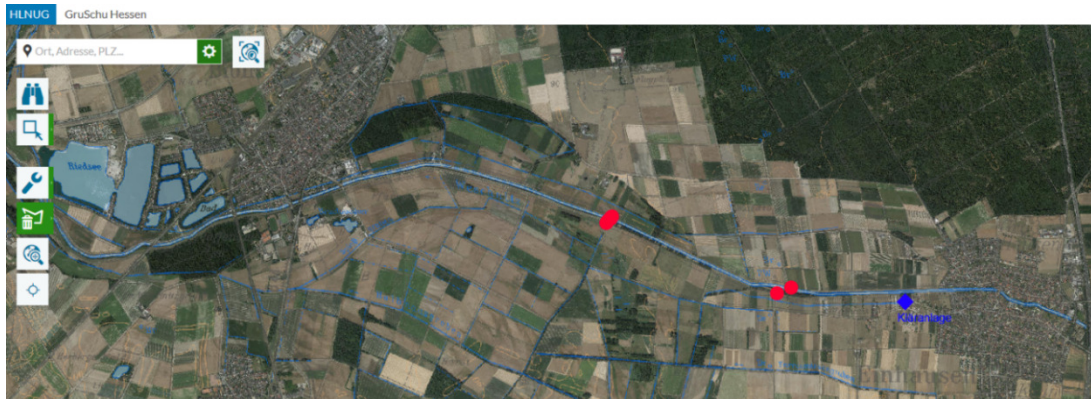


Abbildung 5-13: Hydrogeologische Lage der Messstellen 3 bis 9. Daten entnommen aus GruSchu.

In einer Grundwasserprobe aus dem Jahr 2016 konnte (Epi)-Chlortetracyclin (101 ng L^{-1}) und dessen Transformationsprodukt (Epi)-iso-Chlortetracyclin (1.473 ng L^{-1}) nachgewiesen werden. Die Messstelle befindet sich in Mittelhessen (**Abbildung 5-14**). In 0,71 km Entfernung zur Messstelle befindet sich eine Biogasanlage. Diese ist auf der Karte eingezeichnet (blau). In direkter Umgebung liegen Bauernhöfe und landwirtschaftliche Nutzflächen. Des Weiteren verläuft die Usa in etwa 1 km von der Messstelle entfernt. Die Lage könnte für einen Eintrag aus der Landwirtschaft sprechen. Eine abschließende Bewertung könnte durch die Untersuchung der Gärrückstände der nahegelegenen Biogasanlage oder der Analyse von Bodenproben aus diesem Gebiet erfolgen. Auch könnte die Usa als nahegelegenes Oberflächengewässer auf Antibiotikarückstände untersucht werden. Die hohen Gehalte an (Epi)-iso-Chlortetracyclin könnten jedoch nach den Erkenntnissen aus **Kapitel 5.2** für einen Eintrag aus Fermentationsrückständen sprechen. Dort wurde gezeigt, dass die Isoform des Chlortetracyclins im Zuge der Güllefermentation entsteht.

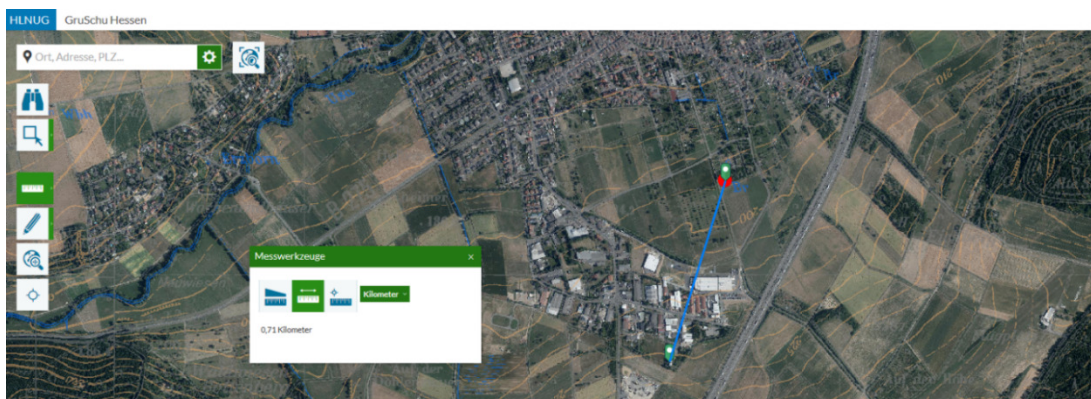


Abbildung 5-14: Hydrogeologische Lage der Messstelle 10. Daten entnommen aus GruSchu.

In einer weiteren Grundwasserprobe aus dem Jahr 2016 konnten 834 ng L^{-1} (Epi)-iso-Chlortetracyclin nachgewiesen werden. **Abbildung 5-15** zeigt, dass sich die Messstelle in einer ländlichen Umgebung mit zahlreichen direkt angrenzenden Ackerflächen befindet. Zudem erstreckt sich ein kleiner See in 50 m Entfernung. Auch hier wird aufgrund der Lage der Messstelle und dem Auffinden des Transformationsproduktes von einem Eintrag aus der Landwirtschaft ausgegangen.



Abbildung 5-15: Hydrogeologische Lage der Messstelle 11. Daten entnommen aus GruSchu.

Wie aus der Lysimeterstudie zu erwarten, waren die Nachweishäufigkeiten von Tetracyclinen in Grundwasserproben sehr viel geringer im Vergleich zu Sulfonamidnachweisen. Dies wurde mit der stärkeren Sorption der Tetracycline an Bodenbestandteile erklärt (K_d Sulfonamide: 0,6 – 4,9; K_d Tetracycline: 290 – 1.620) (Thiele-Bruhn, 2003). Speziellere Ausführungen zu möglichen Bindungsmechanismen und Einflussgrößen auf Sorptionsprozesse wurden bereits in **Kapitel 5.3** diskutiert. Dennoch wurden Positivbefunde in Bezug auf ((Epi)-iso-) Chlortetracyclin in Grundwasserproben ermittelt. Hierbei könnte es sich um Wirkstoffe handeln, die seit vielen Jahren kontinuierlich in die Umwelt eingetragen werden. Studien zeigten bereits eine Pseudopersistenz dieser Wirkstoffe nach mehrmaliger Ausbringung belasteter Gülle (Daughton, 2003). In der Literatur wurde das Auffinden von Tetracyclinen im Wasser über Oberflächenauswaschungsprozesse und deren Bindung an gelöste organische Substanz (DOM: **D**issolved **O**rganic **M**atter) in der Gülle erklärt (Burkhardt et al., 2005; Kreuzig and Höltge, 2005). Als Bindungsarten wurden ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen angenommen (Tolls, 2001). Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass gelöste organische Substanzen den Transport verschiedener organischer Verbindungen in Böden verbessern (Chu et al., 2013; Ding et al., 2014; Kulshrestha et al., 2004). In weiterführender Literatur wird der Transport von Tetracyclinen ferner über einen schnellen präferenziellen Fluss, über Drainagen im Boden und über Makroporenfluss erklärt. Auch ein erleichterter Co-Transport mit mobilen Kolloiden wie DOM wurde in Betracht gezogen (Kay et al., 2004; Röder et al., 2007; Thiele-Bruhn, 2003). Andere Untersuchungen zeigten ebenfalls einen Tetracyclineintrag über güllebeaufschlagte Böden bis in das Grundwasser. In Studien von Hamscher et al. wurden beispielsweise Tetracyclinkonzentrationen von $0,13 \mu\text{g L}^{-1}$ in oberflächennahem Grundwasser (Probentiefe: 1,4 m) nachgewiesen (Hamscher et al., 2005b).

Es ist festzuhalten, dass der größte Teil der untersuchten Grundwasserproben in Hessen die Wirkstoffe (Epi)-Chlortetracyclin, (Epi)-Doxycyclin, Sulfamethazin, Sulfamethoxazol, *N*-Acetyl-Sulfamethazin, *N*-Acetyl-Sulfamethoxazol und (Epi)-iso-Chlortetracyclin in Konzentrationen über 50 ng L^{-1} nicht enthielten. Die wenigen Messstellen mit Positivbefunden lagen in der Nähe von Oberflächengewässern, Siedlungsgebieten oder landwirtschaftlichen Nutzflächen. Um hier abschließend die Eintragsquelle aus der Human- oder Veterinärmedizin identifizieren zu können, sind Rücksprachen mit den dortigen Landwirten über eingesetzte Antibiotika oder Untersuchungen der Gülle und der Ackerböden notwendig. Die nachgewiesenen Konzentrationen bewegten sich im Bereich von 50 ng L^{-1} bis über $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Bislang werden deutsche Grundwässer nicht systematisch auf Antibiotikarückstände untersucht, da die einschlägigen Gesetze hierzu keine Grenzwerte vorsehen (Hannappel et al., 2016). Abgesicherte Schwellenwert-Konzentrationen, welche eine Resistenzbildung begünstigen, sind nicht bekannt. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die detektierten Konzentrationen möglicherweise die Bildung von Resistenzen fördern (Lehmann and Schönfeld, 2015). Die Nachweishäufigkeiten würden durch die Anwendung der für Bodeneluate entwickelten Anreicherungs-methode (**Kapitel 3.11.2**) mit einer Bestimmungsgrenze von 1 ng L^{-1} vermutlich höher ausfallen.

6 Fazit und Ausblick

Die Untersuchung antibiotikahaltiger Rindergülle nach entsprechender Vorbehandlung über anaerobe Fermentation oder aerobe Lagerung zeigte, dass die Wirkstoffe Eliminationsprozessen unterliegen. Diese waren umso ausgeprägter, je länger die Dauer und je höher die Temperatur des Versuchsansatzes gewählt wurde. Auch die Zufuhr von Sauerstoff begünstigte die Eliminierung. In dem Bereich der Güllebehandlung existieren folglich gewisse Spielräume, um die Effizienz der Eliminationsraten zu steigern und somit die Antibiotikaeinträge über die Gülle zu minimieren bzw. die Bioverfügbarkeit herabzusetzen. Auflagen für Landwirte könnten erlassen werden, welche die Lagerbedingungen für Gülle – die im Behandlungszeitraum des Viehbestandes mit Antibiotika anfällt – regeln. Ein großflächiges Güllemonitoring könnte zur Ableitung von entsprechenden Grenzwerten durchgeführt werden. Insbesondere Biobauern sind durch das Verbot der Anwendung synthetischer Mineraldünger (Art. 4 Abs. 1e der Verordnung 834/2007) auf die organische Gülledüngung angewiesen (VO (EG) Nr. 834/2007, 2007). Durch sehr geringe Schadstoffrückstände in biologischen Erzeugnissen könnten diese aufgewertet und dem vorbeugenden Umwelt- und Verbraucherschutz Folge geleistet werden. Auch die Viskosität der Gülle erwies sich als wichtiges Kriterium für die spätere Aufnahme der Wirkstoffe aus dem Gülle-Boden-Gemisch in die Aufwuchspflanzen. Möhrenpflanzen, welche mit gelagerter Gülle gedüngt wurden, wiesen deutlich niedrigere Rückstandsgehalte an Antibiotika auf als vergleichbare Ansätze mit fermentierter Rindergülle. Zusätze zur Erhöhung der Viskosität wären von Vorteil, da Antibiotika an feste Bestandteile binden und so in ihrer Mobilität/Bioverfügbarkeit eingeschränkt werden. Ein weiterer Ansatz zur Minimierung der Einträge von Veterinärantibiotika in die Umwelt wird in der Verabreichung von Tierarzneimitteln als Pellets anstelle von Pulver gesehen. Hierdurch werden Verschleppungen von Antibiotika über Stallstäube in die Stallumgebung minimiert. Für Sulfadiazin konnten hier bereits positive Ergebnisse erzielt werden (Menz and Rümmele, 2015). Neben der Verwendung neuer Arzneimittelformulierungen ist generell der Bedarf an Tierarzneimitteln durch einen hohen Gesundheitsstatus der Tiere gering zu halten. Insbesondere Haltungs- und Hygienebedingungen im Stall können maßgeblich hierzu beitragen und die kurative Gabe von Arzneimitteln verringern. Die Verabreichung der Wirkstoffe bei Krankheiten sollte gezielt und sachgerecht nach dem Prinzip „so viel wie nötig, so wenig wie möglich“ erfolgen. Möglichst keine Breitbandantibiotika, sondern spezifische gegen den jeweiligen Erreger wirksame Medikamente, sollten ausgewählt werden. Auch eine sachgerechte Entsorgung der Arzneimittel ist von Bedeutung. Diese können in Apotheken oder Schadstoffsammelstellen abgegeben werden und sollten ggf. über den Hausmüll und keinesfalls über die Toilette entsorgt werden.

Die über Gülle in den Boden eingetragenen Wirkstoffkonzentrationen lagen theoretisch im mg kg^{-1} -Bereich. Im Boden konnten mit der neu entwickelten Methode Rückstandsgehalte im $\mu\text{g kg}^{-1}$ -Bereich nachgewiesen werden, die v.a. den gut bioverfügbaren Anteil darstellen. Der Lößboden erwies sich als besserer Rückhalt im Vergleich zu dem Sandboden. Dies zeigte sich zum einen anhand der Untersuchung des Weidelgrases. Pflanzen, die auf Lößboden wuchsen,

nahmen deutlich weniger Antibiotika auf als Pflanzen, welche auf Sandböden kultiviert wurden. Auch anhand der Lysimeterstudien zeigte sich eine bessere Infiltration von Antibiotika in dem Sandboden. Für die Abschätzung des Umweltverhaltens spielt der Boden somit eine herausragende Rolle.

Die Grundwasseruntersuchung zeigte einen vermehrten Befund von Sulfamethoxazol, was hauptsächlich auf dessen Einsatz in der Humanmedizin und den Eintrag über die Kläranlagen zurückgeführt wurde. Bislang existieren keine Grenzwerte für Antibiotika im Grundwasser. Eine Probe wies eine Sulfamethoxazolkonzentration von über $1 \mu\text{g L}^{-1}$ auf. Zum Vergleich, es gilt in der EU ein Grenzwert für Rückstände von Pflanzenschutzmitteln in Grund- und Trinkwasser von $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Die Etablierung einer vierten Reinigungsstufe bei Kläranlagen ist derzeit in der Diskussion. Über diese sollen im Anschluss an die Nachklärung im Abwasser befindliche Arzneimittelreste und andere anthropogene Spurenstoffe entfernt werden. Als wirkungsvolle Verfahren für die vierte Reinigungsstufe gelten die Mikrofiltration im Membranbioreaktor, die Ozonierung, die Aktivkohleadsorption und die UV-Bestrahlung (auch mit Zugabe von Wasserstoffperoxid) (Menz and Rümmele, 2015). Insbesondere für Sulfonamide konnte bereits ein Photoabbau nachgewiesen werden (Zhang et al., 2016). Dennoch ist auch dieses Vorhaben der Einführung einer vierten Reinigungsstufe mit Nachteilen verbunden. So kann die Ozonierung möglicherweise zu der Bildung schädlicher Abbau- und Transformationsprodukte führen. An die Herstellung und den Transport von Aktivkohle sind hohe Umweltbelastungen und ein hoher Energieverbrauch geknüpft. Gleiches gilt für den Einsatz von Membranen. Auch die Minimierung antibiotikaresistenter Mikroorganismen im Abwasser ist bislang ungeklärt. Trotz weiterer Abwasseraufbereitung gab es Hinweise auf deren Verbleib im Kläranlagenablauf. Auch eine Selektion antibiotikaresistenter Erreger durch den Einsatz von Ozon ist ungeklärt. Hohe Investitions-, sowie steigende Energie- und Betriebskosten führen zudem zu einer Erhöhung der Abwassergebühren (Menz and Rümmele, 2015). Der Einsatz Metalloxid beschichteter Rechen wurde bislang nicht diskutiert. Dies könnte nach den gewonnenen Erkenntnissen aus dieser Arbeit jedoch ein vielversprechender und kostengünstiger Ansatz sein.

Die nachgewiesenen Wirkstoffkonzentrationen in den Pflanzen lagen deutlich unterhalb der für den Menschen tolerierbaren täglichen Aufnahmeraten (**Kapitel 5.4.5**). Aus diesen Ergebnissen ist kein gesundheitliches Risiko abzuleiten. Die Biotransformation der Wirkstoffe über pflanzliche Detoxifikationsmechanismen (Chee-Sanford et al., 2009) müssten in Zukunft jedoch untersucht werden. Die Bildung von Konjugaten zwischen den Wirkstoffen oder deren Metaboliten mit Zuckern / Kohlenhydraten, die in der Pflanze gebildet wurden sind denkbar. Konjugate sind in der Regel extrahierbare gebundene Rückstände. Die antibiotische Aktivität der gebildeten Abbau- und Transformationsprodukte müsste überprüft werden. Dieses spannende Thema könnte in weiterführenden Forschungsarbeiten näher untersucht werden.

Das Thema Resistenzen ist sowohl im human- als auch im veterinärmedizinischen Bereich von enormer Bedeutung. Daher sollte die Resistenzentwicklung bei verschiedenen Darm- oder Bo-

den Bakterien weiter verfolgt werden. Den Fragen, welche Spurenkonzentrationen zur Ausbildung von Resistenzen beitragen können, ist nachzugehen. Über diesen Weg könnten im Anschluss anhand klinischer Studien Grenzwerte festgelegt werden. Studien von Gullberg et al. zeigten bereits, dass Tetracyclin-Konzentrationen $\geq 15 \mu\text{g L}^{-1}$ die Selektion von Tetracyclin-resistenten Bakterien begünstigen können (Gullberg et al., 2011). Aktuelle Medien-Informationen zur Folge, wurden in vielen Gewässern (Flüsse, Bäche, Badeseen) in Niedersachsen multiresistente Keime nachgewiesen. Als Konsequenz daraus werden zukünftig flächendeckende Kontrollen von Gewässern auf antibiotikaresistente Keime gefordert. Ein Gesundheitsrisiko wird insbesondere für immungeschwächte und ältere Menschen angenommen. Als Eintragsquelle wird das Einleiten von Klinikabwässern in Kläranlagen, sowie das Ausbringen von Gülle vermutet (Tagesschau, 2018).

Wirkstoffe wie Tetracycline (und deren Transformationsprodukte), die vorzugsweise an Wurzeln adsorbieren bzw. in diesen akkumulieren, sollten für weitere Untersuchungen von Wurzel- und Knollengemüse (z.B. Kartoffeln, Radieschen, Möhren, Zwiebeln) unter praxisüblichen Feldbedingungen herangezogen werden. Substanzen die leicht von dem Wurzelbereich in oberirdische Bereiche der Pflanze verlagert werden können (Sulfonamide und deren Metabolite), sollten in wichtigen Nahrungsmitteln des Menschen wie beispielsweise Kopfsalat und Gurken untersucht werden. Auch die Aufnahme antibiotikaresistenter Keime durch die Pflanzen sollte Gegenstand der Untersuchung sein. Des Weiteren ist darüber nachzudenken, ob ein einheitliches Probenaufbereitungsverfahren für verschiedene Matrices und Wirkstoffe sinnvoll erscheint. Nur so kann die Einhaltung von Grenzwerten am besten kontrolliert werden und nationalen und internationalen Vergleichen standhalten.

7 Literaturverzeichnis

- Accinelli, C., Koskinen, W.C., Becker, J.M., Sadowsky, M.J., 2007. Environmental fate of two sulfonamide antimicrobial agents in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 2677–2682. 10.1021/jf063709j.
- Aga, D.S., O'Connor, S., Ensley, S., Payero, J.O., Snow, D., Tarkalson, D., 2005. Determination of the persistence of tetracycline antibiotics and their degradates in manure-amended soil using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 7165–7171. 10.1021/jf050415.
- Agwuh, K.N., MacGowan, A., 2006. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycyclines. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58, 256–265. 10.1093/jac/dkl224.
- Ahmed, M.B.M., Rajapaksha, A.U., Lim, J.E., Vu, N.T., Kim, I.S., Kang, H.M., Lee, S.S., Ok, Y.S., 2015. Distribution and accumulative pattern of tetracyclines and sulfonamides in edible vegetables of cucumber, tomato, and lettuce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 398–405. 10.1021/jf5034637.
- Alexy, R., Kumpel, T., Kümmerer, K., 2004. Assessment of degradation of 18 antibiotics in the Closed Bottle Test. *Chemosphere* 57, 505–512. 10.1016/j.chemosphere.2004.06.024.
- Allaire, S.E., Del Castillo, J., Juneau, V., 2006. Sorption kinetics of chlortetracycline and tylosin on sandy loam and heavy clay soils. *Journal of Environmental Quality* 35, 969–972. 10.2134/jeq2005.0355.
- Alvarez, J.A., Otero, L., Lema, J.M., Omil, F., 2010. The effect and fate of antibiotics during the anaerobic digestion of pig manure. *Bioresource Technology* 101, 8581–8586. 10.1016/j.biortech.2010.06.075.
- Alvarino, T., Nastold, P., Suarez, S., Omil, F., Corvini, P.F.X., Bouju, H., 2016. Role of biotransformation, sorption and mineralization of ¹⁴C-labelled sulfamethoxazole under different redox conditions. *The Science of the Total Environment* 542, 706–715. 10.1016/j.scitotenv.2015.10.140.
- AMG, 2017. Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln - Arzneimittelgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl. I S. 3394), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 18. Juli 2017 (BGBl. I S. 2757) geändert worden ist, 151 pp.
- Aminov, R.I., Mackie, R.I., 2007. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiology Letters* 271, 147–161. 10.1111/j.1574-6968.2007.00757.x.
- Anderson, C.R., Rupp, H.S., Wu, W.-H., 2005. Complexities in tetracycline analysis—chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1075, 23–32. 10.1016/j.chroma.2005.04.013.
- Andreu, V., Vazquez-Roig, P., Blasco, C., Picó, Y., 2009. Determination of tetracycline residues in soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394, 1329–1339. 10.1007/s00216-009-2635-x.
- Arikan, O., Mulbry, W., Ingram, D., Millner, P., 2009a. Minimally managed composting of beef manure at the pilot scale: Effect of manure pile construction on pile temperature profiles and on the fate of oxytetracycline and chlortetracycline. *Bioresource Technology* 100, 4447–4453. 10.1016/j.biortech.2008.12.063.
- Arikan, O.A., 2008. Degradation and metabolization of chlortetracycline during the anaerobic digestion of manure from medicated calves. *Journal of Hazardous Materials* 158, 485–490. 10.1016/j.jhazmat.2008.01.096.
- Arikan, O.A., Mulbry, W., Rice, C., 2009b. Management of antibiotic residues from agricultural sources: Use of composting to reduce chlortetracycline residues in beef manure from treated animals. *Journal of Hazardous Materials* 164, 483–489. 10.1016/j.jhazmat.2008.08.019.
- Arikan, O.A., Sikora, L.J., Mulbry, W., Khan, S.U., Foster, G.D., 2007. Composting rapidly reduces levels of extractable oxytetracycline in manure from therapeutically treated beef calves. *Bioresource Technology* 98, 169–176. 10.1016/j.biortech.2005.10.041.
- Aristilde, L., Lanson, B., Miéhe-Brendlé, J., Marichal, C., Charlet, L., 2016. Enhanced interlayer trapping of a tetracycline antibiotic within montmorillonite layers in the presence of Ca and Mg. *Journal of Colloid and Interface Science* 464, 153–159. 10.1016/j.jcis.2015.11.027.
- Aronson, A.L., 1980. Pharmacotherapeutics of the newer tetracyclines. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1061–1068.
- Aust, M.-O., Godlinski, F., Travis, G.R., Hao, X., McAllister, T.A., Leinweber, P., Thiele-Bruhn, S., 2008. Distribution of sulfamethazine, chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle. *Environmental Pollution* 156, 1243–1251. 10.1016/j.envpol.2008.03.011.
- Avisar, D., Primor, O., Gozlan, I., Mamane, H., 2010. Sorption of sulfonamides and tetracyclines to montmorillonite clay. *Water, Air, & Soil Pollution* 209, 439–450. 10.1007/s11270-009-0212-8.
- AVV, 2001. Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Anerkennung und Nutzungsgenehmigung von natürlichem Mineralwasser vom 9. März 2001. http://www.verwaltungsvorschriften-im-internet.de/bsvwbund_09032001_316841230000.htm. Accessed June 2018.
- Awad, Y.M., Kim, S.-C., Abd El-Azeem, S.A.M., Kim, K.-H., Kim, K.-R., Kim, K., Jeon, C., Lee, S.S., Ok, Y.S., 2014. Veterinary antibiotics contamination in water, sediment, and soil near a swine manure composting facility. *Environmental Earth Sciences* 71, 1433–1440. 10.1007/s12665-013-2548-z.
- Azanu, D., Mortey, C., Darko, G., Weisser, J.J., Styrihave, B., Abaidoo, R.C., 2016. Uptake of antibiotics from irrigation water by plants. *Chemosphere* 157, 107–114. 10.1016/j.chemosphere.2016.05.035.
- Bailey, C., 2015. The overland transport of veterinary antibiotics. Dissertation, Aachen, 161 pp.
- Bailey, C., Spielmeier, A., Frings, R.M., Hamscher, G., Schüttrumpf, H., 2015. From agricultural fields to surface water systems: The overland transport of veterinary antibiotics. *Journal of Soils and Sediments* 15, 1630–1634. 10.1007/s11368-015-1140-4.

- Bailey, C., Spielmeier, A., Hamscher, G., Schüttrumpf, H., Frings, R.M., 2016. The veterinary antibiotic journey: Comparing the behaviour of sulfadiazine, sulfamethazine, sulfamethoxazole and tetracycline in cow excrement and two soils. *Journal of Soils and Sediments* 16, 1690–1704. 10.1007/s11368-016-1370-0.
- Bao, Y., Zhou, Q., Guan, L., Wang, Y., 2009. Depletion of chlortetracycline during composting of aged and spiked manures. *Waste Management (New York, N.Y.)* 29, 1416–1423. 10.1016/j.wasman.2008.08.022.
- Batt, A.L., Aga, D.S., 2005. Simultaneous analysis of multiple classes of antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contamination. *Analytical Chemistry* 77, 2940–2947. 10.1021/ac048512.
- Batt, A.L., Kim, S., Aga, D.S., 2007. Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations. *Chemosphere* 68, 428–435. 10.1016/j.chemosphere.2007.01.008.
- Batt, A.L., Snow, D.D., Aga, D.S., 2006. Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA. *Chemosphere* 64, 1963–1971. 10.1016/j.chemosphere.2006.01.029.
- Bauer, A., Lizasoain, J., Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt, K., Klocke, M., Rincón, M., Amon, T., Piringer, G., 2014. Effects of the antibiotics chlortetracycline and enrofloxacin on the anaerobic digestion in continuous experiments. *BioEnergy Research* 7, 1244–1252. 10.1007/s12155-014-9458-0.
- Bäurle, H., Tamásy, C., 2012. Regionale Konzentrationen der Nutztierhaltung in Deutschland: Mitteilungen, Heft 79, Institut für Strukturforchung und Planung in agrarischen Intensivgebieten ((ISPA), Universität Vechta.
- Berendsen, B.J.A., Wegh, R.S., Memelink, J., Zuidema, T., Stolker, L.A.M., 2015. The analysis of animal faeces as a tool to monitor antibiotic usage. *Talanta* 132, 258–268. 10.1016/j.talanta.2014.09.022.
- Berger, K., Petersen, B., Büning-Pfaue, H., 1986. Persistenz von Gülle-Arzneistoffen in der Nahrungskette. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 85–108.
- BfR, 2010. Rückstände von Tierarzneimitteln in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft - Information Nr. 019/2010 des BfR vom 15. Februar 2010, 5 pp. https://www.bfr.bund.de/cm/343/rueckstaende_von_tierarzneimitteln_in_lebensmitteln_pflanzlicher_herkunft.pdf. Accessed June 2018.
- BfR, 2016a. Bewertung der Ergebnisse des Nationalen Rückstandskontroll- und des Einfuhrüberwachungsplanes 2014: Keine gesundheitlichen Risiken zu erwarten: Stellungnahme des BfR 026/2016 vom 31. August 2016, 34 pp. <https://www.bfr.bund.de/cm/343/bewertung-der-ergebnisse-des-nationalen-rueckstandskontroll-und-des-einfuhrueberwachungsplanes-2014-keine-gesundheitlichen-risiken-zu-erwarten.pdf>. Accessed June 2018.
- BfR, 2016b. Fragen und Antworten zu den Auswirkungen des Antibiotika-Einsatzes in der Nutztierhaltung: Aktualisierte FAQ des BfR vom 03. August 2016, 5 pp. <https://www.bfr.bund.de/cm/343/fragen-und-antworten-zu-den-auswirkungen-des-antibiotika-einsatzes-in-der-nutztierhaltung.pdf>. Accessed June 2018.
- Białk-Bielińska, A., Kumirska, J., Palavinskas, R., Stepnowski, P., 2009. Optimization of multiple reaction monitoring mode for the trace analysis of veterinary sulfonamides by LC-MS/MS. *Talanta* 80, 947–953. 10.1016/j.talanta.2009.08.023.
- Blackwell, P.A., Boxall, A.B.A., Kay, P., Noble, H., 2005. Evaluation of a lower tier exposure assessment model for veterinary medicines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2192–2201. 10.1021/jf049527b.
- Blackwell, P.A., Kay, P., Ashauer, R., Boxall, A.B.A., 2009. Effects of agricultural conditions on the leaching behaviour of veterinary antibiotics in soils. *Chemosphere* 75, 13–19. 10.1016/j.chemosphere.2008.11.070.
- Blackwell, P.A., Kay, P., Boxall, A.B.A., 2007. The dissipation and transport of veterinary antibiotics in a sandy loam soil. *Chemosphere* 67, 292–299. 10.1016/j.chemosphere.2006.09.095.
- Blackwood, R.K., English, A.R., 1970. Structure–activity relationships in the tetracycline series. *Advances in Applied Microbiology* 13, 237–266. 10.1016/S0065-2164(08)70405-2.
- Böhm, R., 1996. Auswirkungen von Rückständen von Antiinfektiva in tierischen Ausscheidungen auf die Güllebehandlung und den Boden. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 237–284.
- Boonsaner, M., Hawker, D.W., 2010. Accumulation of oxytetracycline and norfloxacin from saline soil by soybeans. *The Science of the Total Environment* 408, 1731–1737. 10.1016/j.scitotenv.2009.12.032.
- Boonsaner, M., Hawker, D.W., 2012. Investigation of the mechanism of uptake and accumulation of zwitterionic tetracyclines by rice (*Oryza sativa* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78, 142–147. 10.1016/j.ecoenv.2011.11.023.
- Botitsi, E., Frosyni, C., Tsiipi, D., 2007. Determination of pharmaceuticals from different therapeutic classes in wastewaters by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 1317–1327. 10.1007/s00216-006-0804-8.
- Boxall, A., Long, C., 2005. Veterinary medicines and the environment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 759. 10.1897/1552-8618(2005)24<759:VMATE>2.0.CO;2.
- Boxall, A.B.A., 2004. The environmental side effects of medication: How are human and veterinary medicines in soils and water bodies affecting human and environmental health? *EMBO Reports* 5, 1110–1116. 10.1038/sj.embor.7400307.
- Boxall, A.B.A., Blackwell, P., Cavallo, R., Kay, P., Tolls, J., 2002. The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. *Toxicology Letters* 131, 19–28. 10.1016/S0378-4274(02)00063-2.
- Boxall, A.B.A., Fogg, P.A., Blackwell, P.A., Kay, P., Pemberton, E.J., Croxford, A., 2004. Veterinary medicines in the environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 1–91.
- Boxall, A.B.A., Johnson, P., Smith, E.J., Sinclair, C.J., Stutt, E., Levy, L.S., 2006. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2288–2297. 10.1021/jf053041t.
- Boxall, A.B.A., Kolpin, D.W., Halling-Sørensen, B., Tolls, J., 2003. Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environmental Science & Technology*, 286–294. 10.1021/es032519b.
- Briggs, G.G., Bromilow, R.H., Evans, A.A., 1982. Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionised chemicals by barley. *Pesticide Science* 13, 495–504. 10.1002/ps.2780130506.
- Bruice, P.Y., 2007. *Organische Chemie*, 5th ed. Pearson Studium, München.

- Bryan, P.D., Hawkins, K.R., Stewart, J.T., Capomacchia, A.C., 1992. Analysis of chlortetracycline by high performance liquid chromatography with postcolumn alkaline-induced fluorescence detection. *Biomedical Chromatography*, 305–310. 10.1002/bmc.1130060612.
- BTK, 2015. Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln. https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Tier/Tiergesundheits/Tierarzneimittel/Bundestieraerztekammer_LeitlinienAntibiotika.pdf?__blob=publicationFile. Accessed June 2018.
- Burkhardt, M., Stamm, C., 2007. Depth distribution of sulfonamide antibiotics in pore water of an undisturbed loamy grassland soil. *Journal of Environmental Quality* 36, 588–596. 10.2134/jeq2006.0358.
- Burkhardt, M., Stamm, C., Waul, C., Singer, H., Müller, S., 2005. Surface runoff and transport of sulfonamide antibiotics and tracers on manured grassland. *Journal of Environmental Quality* 34, 1363–1371. 10.2134/jeq2004.0261.
- BVL, 2017. Erneut weniger Antibiotika an Tierärzte abgegeben: Abgabemenge der Antibiotika mit besonderer Bedeutung für die Therapie beim Menschen liegt leicht über dem Niveau von 2011. https://www.bvl.bund.de/DE/08_PresseInfothek/01_FuerJournalisten_Presse/01_Pressemitteilungen/05_Tierarzneimittel/2017/2017_09_11_pi_Antibiotikaabgabemenge2016.html. Accessed June 2018.
- Cammann, K., 2001. Instrumentelle Analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen und Qualitätssicherung. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
- Campagnolo, E.R., Johnson, K.R., Karpati, A., Rubin, C.S., Kolpin, D.W., Meyer, M.T., Esteban, J.E., Currier, R.W., Smith, K., Thu, K.M., McGeehin, M., 2002. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. *Science of the Total Environment* 299, 89–95. 10.1016/S0048-9697(02)00233-4.
- Campbell, N.A., Reece, J.B., Held, A., Markl, J. (Eds.), 2008. *Biologie*, 6th ed. Pearson Studium, München, 1606 pp.
- Carballa, M., Omil, F., Ternes, T., Lema, J.M., 2007. Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Research* 41, 2139–2150. 10.1016/j.watres.2007.02.012.
- Carrasquillo, A.J., Bruland, G.L., MacKay, A.A., Vasudevan, D., 2008. Sorption of ciprofloxacin and oxytetracycline zwitterions to soils and soil minerals: Influence of compound structure. *Environmental Science & Technology* 42, 7634–7642. 10.1021/es801277y.
- Carter, L.J., Harris, E., Williams, M., Ryan, J.J., Kookana, R.S., Boxall, A.B.A., 2014. Fate and uptake of pharmaceuticals in soil-plant systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 816–825. 10.1021/jf404282y.
- Carvalho, I.T., Santos, L., 2016. Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment international* 94, 736–757. 10.1016/j.envint.2016.06.025.
- Center for Disease Dynamics, Economics & Policy, 2015. The state of the world's antibiotics 2015. CDDEP; Washington, D.C.
- Cessna, A.J., Larney, F.J., Kuchta, S.L., Hao, X., Entz, T., Topp, E., McAllister, T.A., 2011. Veterinary antimicrobials in feedlot manure: Dissipation during composting and effects on composting processes. *Journal of Environment Quality* 40, 188. 10.2134/jeq2010.0079.
- Chadwick, D.R., Chen, S. (Eds.), 2002. Manures. In: Haygarth, P. M.; Jarvis, S. C., *Agriculture, hydrology, and water quality*. CABI Pub, Wallingford UK, New York, xii, 502.
- Chatterjee, J., Rai, N., K Sar, S., 2014. Kinetic isotherm of amoxicillin antibiotic through adsorption and its removal by electrocoagulation. *Oriental Journal of Chemistry* 30, 775–784. 10.13005/ojc/300251.
- Chee-Sanford, J.C., Mackie, R.I., Koike, S., Krapac, I.G., Lin, Y.-F., Yannarell, A.C., Maxwell, S., Aminov, R.I., 2009. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *Journal of Environmental Quality* 38, 1086–1108. 10.2134/jeq2008.0128.
- Chen, K.-L., Liu, L.-C., Chen, W.-R., 2017. Adsorption of sulfamethoxazole and sulfapyridine antibiotics in high organic content soils. *Environmental Pollution*. 10.1016/j.envpol.2017.08.011.
- Chen, Y., Zhang, H., Luo, Y., Song, J., 2012. Occurrence and assessment of veterinary antibiotics in swine manures: A case study in East China. *Chinese Science Bulletin* 57, 606–614. 10.1007/s11434-011-4830-3.
- Cheng, W., Kuzyakov, Y., 2005. Root effects on soil organic matter decomposition. *American Society of Agronomy*, 119–144. 10.2134/agronmonogr48.c7.
- Chitescu, C.L., Nicolau, A.I., Stolker, A.A.M., 2013. Uptake of oxytetracycline, sulfamethoxazole and ketoconazole from fertilised soils by plants. *Food Additives & Contaminants. Part A* 30, 1138–1146. 10.1080/19440049.2012.725479.
- Chitescu, C.L., Oosterink, E., Jong, J. de, Stolker, A.A.M.L., 2012. Ultrasonic or accelerated solvent extraction followed by U-HPLC-high mass accuracy MS for screening of pharmaceuticals and fungicides in soil and plant samples. *Talanta* 88, 653–662. 10.1016/j.talanta.2011.11.054.
- Chopra, I., Roberts, M., 2001. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65, 232–260. 10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001.
- Choquet-Kastylevsky, G., Vial, T., Descotes, J., 2002. Allergic adverse reactions to sulfonamides. *Current Allergy and Asthma Reports* 2, 16–25. 10.1007/s11882-002-0033-y.
- Christian, T., Schneider, R.J., Färber, H.A., Skutlarek, D., Meyer, M.T., Goldbach, H.E., 2003. Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 31, 36–44. 10.1002/aheh.200390014.
- Chu, B., Goyné, K.W., Anderson, S.H., Lin, C.-H., Lerch, R.N., 2013. Sulfamethazine sorption to soil: Vegetative management, pH, and dissolved organic matter effects. *Journal of Environmental Quality* 42, 794–805. 10.2134/jeq2012.0222.
- Chung, H.S., Lee, Y.-J., Rahman, M.M., Abd El-Aty, A.M., Lee, H.S., Kabir, M.H., Kim, S.W., Park, B.-J., Kim, J.-E., Hacimüftüoğlu, F., Nahar, N., Shin, H.-C., Shim, J.-H., 2017. Uptake of the veterinary antibiotics chlortetracycline, enrofloxacin, and sulphathiazole from soil by radish. *The Science of the Total Environment* 605–606, 322–331. 10.1016/j.scitotenv.2017.06.231.
- Ciffroy, P., Tediosi, A., Capri, E. (Eds.), 2018. *Modelling the fate of chemicals in the environment and the human body*. Springer International Publishing, Cham, s.l., 19 pp.

- Clara, M., Gans, O., Humer, F., Weiß, S., Zieritz, I., 2010. Antibiotika im Grundwasser: Sondermessprogramm im Rahmen der Gewässerzustandsüberwachungsverordnung. Umweltbundesamt, 1–60.
- Cohen Freue, G.V., Borchers, C.H., 2012. Multiple reaction monitoring (MRM): Principles and application to coronary artery disease. *Circulation Cardiovascular Genetics* 5, 378. 10.1161/CIRCGENETICS.111.959528.
- D'Angelo, E., 2017. Sorption-desorption equilibrium and diffusion of tetracycline in poultry litter and municipal biosolids soil amendments. *Chemosphere* 188, 494–501. 10.1016/j.chemosphere.2017.09.015.
- Daughton, C.G., 2003. Cradle-to-cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. I. Rationale for and avenues toward a green pharmacy. *Environmental Health Perspectives*, 757–774.
- Davis, J.G., Truman, C.C., Kim, S.C., Ascough, J.C.2., Carlson, K., 2006. Antibiotic transport via runoff and soil loss. *Journal of Environmental Quality* 35, 2250–2260. 10.2134/jeq2005.0348.
- De Liguoro, M., Cibir, V., Capolongo, F., Halling-Sørensen, B., Montesissa, C., 2003. Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: Evaluation of transfer to manure and soil. *Chemosphere* 52, 203–212. 10.1016/S0045-6535(03)00284-4.
- Dettenmaier, E.M., Doucette, W.J., Bugbee, B., 2009. Chemical hydrophobicity and uptake by plant roots. *Environmental Science & Technology* 43, 324–329. 10.1021/es801751x.
- Devillers, J. (Ed.), 2009. *Ecotoxicology Modeling*. Springer US, Boston, MA, 400 pp.
- Díaz-Cruz, M.S., García-Galán, M.J., Barceló, D., 2008. Highly sensitive simultaneous determination of sulfonamide antibiotics and one metabolite in environmental waters by liquid chromatography-quadrupole linear ion trap-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1193, 50–59. 10.1016/j.chroma.2008.03.029.
- DIN 32645:2008-11, 2008. *Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung*. Ausgabedatum: November 2008.
- DIN ISO 11465:1996-12, 1996. *Bodenbeschaffenheit - Bestimmung des Trockenrückstandes und des Wassergehalts auf Grundlage der Masse - gravimetrisches Verfahren*. Ausgabedatum: Dezember 1996.
- Ding, G.-C., Radl, V., Schloter-Hai, B., Jechalke, S., Heuer, H., Smalla, K., Schloter, M., 2014. Dynamics of soil bacterial communities in response to repeated application of manure containing sulfadiazine. *PLoS One* 9, e92958. 10.1371/journal.pone.0092958.
- Dolliver, H., Gupta, S., Noll, S., 2008. Antibiotic degradation during manure composting. *Journal of Environmental Quality* 37, 1245–1253. 10.2134/jeq2007.0399.
- Dolliver, H., Kumar, K., Gupta, S., 2007. Sulfamethazine uptake by plants from manure-amended soil. *Journal of Environmental Quality* 36, 1224–1230. 10.2134/jeq2006.0266.
- Domagk, G., 1935. Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift* 61, 250–253. 10.1055/s-0028-1129486.
- Doretto, K.M., Peruchi, L.M., Rath, S., 2014. Sorption and desorption of sulfadimethoxine, sulfaquinoxaline and sulfamethazine antimicrobials in Brazilian soils. *The Science of the Total Environment* 476-477, 406–414. 10.1016/j.scitotenv.2014.01.024.
- Doucette, W.J., Shunthirasingham, C., Dettenmaier, E.M., Zaleski, R.T., Fantke, P., Arnot, J.A., 2018. A review of measured bioaccumulation data on terrestrial plants for organic chemicals: Metrics, variability, and the need for standardized measurement protocols. *Environmental Toxicology and Chemistry* 37, 21–33. 10.1002/etc.3992.
- Doyle, M.E., 2006. Veterinary drug residues in processed meats — potential health risk. Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison Briefings.
- Du, L., Liu, W., 2012. Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro-ecosystems. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 32, 309–327. 10.1007/s13593-011-0062-9.
- Duggar, B.M., 1948. Aureomycin: A product of the continuing search for new antibiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 51, 177–181. 10.1111/j.1749-6632.1948.tb27262.x.
- DüNG, 2017. *Düngegesetz vom 9. Januar 2009 (BGBl. I S. 54, 136), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 5. Mai 2017 (BGBl. I S. 1068) geändert worden ist*, 13 pp.
- Dürkheimer, W., 1975. Tetracycline: Chemie, Biochemie und Struktur-Wirkungs-Beziehungen. *Angewandte Chemie* 87, 751–764. 10.1002/ange.19750872103.
- DüV, 2017. *Verordnung über die Anwendung von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln nach den Grundsätzen der guten fachlichen Praxis beim Düngen: Düngeverordnung vom 26. Mai 2017*, 42 pp.
- Eggen, T., Asp, T.N., Grave, K., Hormazabal, V., 2011. Uptake and translocation of metformin, ciprofloxacin and narasin in forage- and crop plants. *Chemosphere* 85, 26–33. 10.1016/j.chemosphere.2011.06.041.
- Elfrich, R., 2012. Für hochwertiges Grundfutter Wurzelwachstum fördern. *Milchpraxis* 50.
- Elmund, G.K., Morrison, S.M., Grant, D.W., Nevins, M.P., 1971. Role of excreted chlortetracycline in modifying the decomposition process in feedlot waste. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 6, 129–132. 10.1007/BF01540093.
- EMA, 2012. *VICH GL36(R): Studies to evaluate the safety of residues of veterinary drugs in human food: general approach to establish a microbiological ADI*. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/07/WC500130367.pdf. Accessed June 2018.
- EMA, 2016. *Guideline on environmental impact assessment for veterinary medicinal products in support of the VICH guidelines GL6 and GL38*. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004386.pdf. Accessed June 2018.
- EMA, 2017. *Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015. Trends from 2010 to 2015. Seventh ESVAC report*, 1–184.

- EMA, 1997. Committee for veterinary medicinal products: Doxycycline: Summary Report (2) (EMA/MRL/270/97-Final). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500013941.pdf. Accessed June 2018.
- Engels, H., 2004. Verhalten von ausgewählten Tetracyclinen und Sulfonamiden in Wirtschaftsdünger und in Böden. Dissertation, Göttingen, 139 pp.
- European Commission, 2016. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11945/2015.
- Fantke, P., Arnot, J.A., Doucette, W.J., 2016. Improving plant bioaccumulation science through consistent reporting of experimental data. *Journal of Environmental Management* 181, 374–384. 10.1016/j.jenvman.2016.06.065.
- Feng, Y., Wei, C., Zhang, W., Liu, Y., Li, Z., Hu, H., Xue, J., Davis, M., 2016. A simple and economic method for simultaneous determination of 11 antibiotics in manure by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Soils and Sediments* 16, 2242–2251. 10.1007/s11368-016-1414-5.
- Fent, K., 2007. Ökotoxikologie: Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie; 63 Tabellen, 3rd ed. Thieme, Stuttgart, 338 pp.
- Figueroa, R.A., Leonard, A., MacKay, A.A., 2004. Modeling tetracycline antibiotic sorption to clays. *Environmental Science & Technology* 38, 476–483. 10.1021/es0342087.
- Figueroa-Diva, R.A., Vasudevan, D., MacKay, A.A., 2010. Trends in soil sorption coefficients within common antimicrobial families. *Chemosphere* 79, 786–793. 10.1016/j.chemosphere.2010.03.017.
- Fille, M., Ziesing, S., 2016. Antibakterielle Wirkung, In: Sauerbaum, S., Burchard, G.D., Kaufmann, S., Schulz, T. (eds) - Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin, Heidelberg, 709–711. 10.1007/978-3-662-48678-8_88.
- Förster, M., Laabs, V., Lamshöft, M., Groeneweg, J., Zühlke, S., Spittler, M., Krauss, M., Kaupenjohann, M., Amelung, W., 2009. Sequestration of manure-applied sulfadiazine residues in soils. *Environmental Science & Technology* 43, 1824–1830. 10.1021/es8026538.
- Forth, W. (Ed.), 2001. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker, 8th ed. Urban & Fischer, München, 1258 pp.
- Franco, A., Trapp, S., 2008. Estimation of the soil-water partition coefficient normalized to organic carbon for ionizable organic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1995–2004. 10.1897/07-583.1.
- Franklin, A.M., Williams, C.F., Andrews, D.M., Woodward, E.E., Watson, J.E., 2016. Uptake of three antibiotics and an antiepileptic drug by wheat crops spray irrigated with wastewater treatment plant effluent. *Journal of Environmental Quality* 45, 546–554. 10.2134/jeq2015.05.0257.
- Freitag, M., Yolcu, D.H., Hayen, H., Betsche, T., Grote, M., 2008. Screening zum Antibiotika-Transfer aus dem Boden in Getreide in Regionen Nordrhein-Westfalens mit großen Viehbeständen. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 3, 174–184. 10.1007/s00003-008-0329-5.
- Frimmel, F.H., Müller, M.B. (Eds.), 2006. Heil-Lasten: Arzneimittelrückstände in Gewässern; 10. Berliner Kolloquium der Gottlieb Daimler- und Karl Benz-Stiftung. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 242 pp.
- Galler, J., 2009. Wirtschaftsdünger: Anfall, Lagerung, Verwertung, Umwelt. Landwirtschaftskammer Salzburg, 1–64.
- Gans, O., Pfundtner, E., Winckler, C., Bauer, A., 2010. Antibiotika in Biogasanlagen: Abbauverhalten und Einfluss auf die Biogasproduktion. Umweltbundesamt, 1–52.
- Gao, J., Hedman, C., Liu, C., Guo, T., Pedersen, J.A., 2012. Transformation of sulfamethazine by manganese oxide in aqueous solution. *Environmental Science & Technology* 46, 2642–2651. 10.1021/es202492h.
- Gao, J., Pedersen, J.A., 2005. Adsorption of sulfonamide antimicrobial agents to clay minerals. *Environmental Science & Technology* 39, 9509–9516. 10.1021/es050644c.
- Gao, J., Pedersen, J.A., 2010. Sorption of sulfonamide antimicrobial agents to humic acid-clay complexes. *Journal of Environmental Quality* 39, 228–235. 10.2134/jeq2008.0274.
- García-Galán, M.J., Díaz-Cruz, S., Barceló, D., 2013. Multiresidue trace analysis of sulfonamide antibiotics and their metabolites in soils and sewage sludge by pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-electrospray-quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Journal of chromatography. A* 1275, 32–40. 10.1016/j.chroma.2012.12.004.
- García-Galán, M.J., Garrido, T., Fraile, J., Ginebreda, A., Diaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2011. Application of fully automated online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry for the determination of sulfonamides and their acetylated metabolites in groundwater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399, 795–806. 10.1007/s00216-010-4367-3.
- García-Galán, M.J., Silvia Díaz-Cruz, M., Barceló, D., 2008. Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. *Trends in Analytical Chemistry* 27, 1008–1022. 10.1016/j.trac.2008.10.001.
- Gartiser, S., Ulrich, E., Alexy, R., Kümmerer, K., 2007. Anaerobic inhibition and biodegradation of antibiotics in ISO test schemes. *Chemosphere* 66, 1839–1848. 10.1016/j.chemosphere.2006.08.040.
- Gast, R.K., Stephens, J.F., 1988. Effects of kanamycin administration to poultry on the proliferation of drug-resistant salmonella. *Poultry Science*, 689–698.
- Ghose, A.K., Viswanadhan, V.N., Wendoloski, J.J., 1999. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A Qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 55–68. 10.1021/cc9800071.
- Gobas, F.A.P.C., Burkhard, L.P., Doucette, W.J., Sappington, K.G., Verbruggen, E.M.J., Hope, B.K., Bonnell, M.A., Arnot, J.A., Tarazona, J.V., 2016. Review of existing terrestrial bioaccumulation models and terrestrial bioaccumulation modeling needs for organic chemicals. *Integrated Environmental Assessment and Management* 12, 123–134. 10.1002/ieam.1690.

- Goldstein, M., Shenker, M., Chefetz, B., 2014. Insights into the uptake processes of wastewater-borne pharmaceuticals by vegetables. *Environmental Science & Technology* 48, 5593–5600. 10.1021/es5008615.
- Grave, K., Torren-Edo, J., Mackay, D., 2010. Comparison of the sales of veterinary antibacterial agents between 10 European countries. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65, 2037–2040. 10.1093/jac/dkq247.
- Gross, J.H., 2013. *Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch*. Springer Berlin Heidelberg.
- Grote, M., Meriç, D.H., Langenkämper, G., Hayen, H., Betsche, T., Freitag, M., 2009. Untersuchungen zum Transfer pharmakologisch wirksamer Substanzen aus der Nutztierhaltung in Porree und Weißkohl. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 4, 287–304. 10.1007/s00003-009-0316-5.
- Grote, M., Schwake-Anduschus, C., Michel, R., Stevens, H., Heyser, W., Langenkämper, G., Betsche, T. and Freitag, M., 2007. Incorporation of veterinary antibiotics into crops from manured soil. *Landbauforschung Völkenrode* 1, 25–32.
- Grote, M., Schwake-Anduschus, C., Stevens, H., Michel, R., Betsche, T., Freitag, M., 2006. Antibiotika-Aufnahme von Nutzpflanzen aus Gülle-gedüngten Böden – Ergebnisse eines Modellversuchs. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 38–50. 10.1007/s00003-006-0008-3.
- Grundmann, E., 2001. Gerhard Domagk: Ein Pathologe besiegt die bakteriellen Infektionskrankheiten. *Der Pathologe* 22, 241–251. 10.1007/s002920100469.
- GruSchu Hessen. Fachinformationssystem Grundwasser- und Trinkwasserschutz Hessen des HLNUG. gruschu.hessen.de. Accessed June 2018.
- GrwV, 2017. Verordnung zum Schutz des Grundwassers - Grundwasserverordnung vom 9. November 2010 (BGBl. I S. 1513), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 4. Mai 2017 (BGBl. I S. 1044) geändert worden ist, 16 pp.
- Guillarme, D., Ruta, J., Rudaz, S., Veuthey, J.-L., 2010. New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: A critical comparison of existing approaches. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397, 1069–1082. 10.1007/s00216-009-3305-8.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., Andersson, D.I., 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathogens* 7, e1002158. 10.1371/journal.ppat.1002158.
- Hall, J.C., Wickenden, J.S., Yau, K.Y.F., 2000. Biochemical conjugation of pesticides in plants and microorganisms: An overview of similarities and divergences, In: *Pesticide biotransformation in plants and microorganisms*; Hall, J., et al; ACS Symposium Series. American Chemical Society: Washington DC, 89–118. 10.1021/bk-2001-0777.ch005.
- Haller, M., Müller, S., McArdell, C.S., Alder, A.C., Suter, M., 2002. Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 952, 111–120.
- Halling-Sørensen, B., Sengeløv, G., Ingerslev, F., Jensen, L.B., 2003. Reduced antimicrobial potencies of oxytetracycline, tylosin, sulfadiazin, streptomycin, ciprofloxacin, and olaquinox due to environmental processes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44, 7–16. 10.1007/s00244-002-1234-z.
- Halling-Sørensen, B., Sengeløv, G., Tjørnelund, J., 2002. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42, 263–271. 10.1007/s00244-001-0017-2.
- Hamscher, G., 2008. Review: Tierarzneimittel in der Umwelt unter besonderer Berücksichtigung von Stallstäuben. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 3, 165–173. 10.1007/s00003-008-0342-8.
- Hamscher, G., Mohring, S., 2012. Tierarzneimittel in Böden und in der aquatischen Umwelt. *Chemie Ingenieur Technik* 84, 1052–1061. 10.1002/cite.201100255.
- Hamscher, G., Pawelzick, H.T., Höper, H., Nau, H. (Eds.), 2003a. Tierarzneimittelrückstände in Wirtschaftsdüngern, Boden, Sicker- und Grundwasser, In: *Spurenstoffe in Gewässern: Pharmazeutische Reststoffe und endokrin wirksame Substanzen* (eds T. Track and G. Kreysa). WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Hamscher, G., Pawelzick, H.T., Höper, H., Nau, H., 2005a. Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 861–868. 10.1897/04-182R.1.
- Hamscher, G., Pawelzick, H.T., Höper, H., Nau, H., 2005b. Tierarzneimittel in Böden - eine Grundwassergefährdung?, In: *Tagungsband des Fachgesprächs "Arzneimittel in der Umwelt - Zu Risiken und Nebenwirkungen fragen sie das Umweltbundesamt"*. Herausgeber: Umweltbundesamt Berlin, 175–184.
- Hamscher, G., Pawelzick, H.T., Sczesny, S., Nau, H., Hartung, J., 2003b. Antibiotics in dust originating from a pig-fattening farm: A new source of health hazard for farmers? *Environmental Health Perspectives* 111, 1590–1594. 10.1289/ehp.6288.
- Hamscher, G., Sczesny, S., Abu-Qare, A., Höper, H., Nau, H., 2000. Stoffe mit pharmakologischer Wirkung einschließlich hormonell aktiver Substanzen in der Umwelt: Nachweis von Tetracyclinen in gülle-gedüngten Böden. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 107, 332–334.
- Hamscher, G., Sczesny, S., Höper, H., Nau, H., 2002. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 74, 1509–1518. 10.1021/ac015588m.
- Hannappel, S., Groeneweg, J., Zühlke, S., 2014. Antibiotika und Antiparasitika im Grundwasser unter Standorten mit hoher Viehbesatzdichte. *Texte 27/2014. Umweltbundesamt*, 1–169.
- Hannappel, S., Köpp, C., Zühlke, S., 2016. Aufklärung der Ursachen von Tierarzneimittelfunden im Grundwasser – Untersuchung eintragsgefährdeter Standorte in Norddeutschland. *Texte 54/2016. Umweltbundesamt*, 1–188.
- Hashmi, M.Z., Strezov, V., Varma, A. (Eds.), 2017. *Antibiotics and antibiotics resistance genes in soils: Monitoring, toxicity, risk assessment and management*. Springer International Publishing, Cham, 419 pp.
- Hatzinger, P.B., Alexander, M., 1997. Biodegradation of organic compounds sequestered in organic solids or in nanopores within silica particles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 2215–2221. 10.1002/etc.5620161103.

- Hawker, D.W., Cropp, R., Boonsaner, M., 2013. Uptake of zwitterionic antibiotics by rice (*Oryza sativa* L.) in contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 263, 458–466. 10.1016/j.jhazmat.2013.09.066.
- Hebert, V.R., Miller, G.C., 1990. Depth dependence of direct and indirect photolysis on soil surfaces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 913–918. 10.1021/jf00093a069.
- Heise, J., Höltge, S., Schrader, S., Kreuzig, R., 2006. Chemical and biological characterization of non-extractable sulfonamide residues in soil. *Chemosphere* 65, 2352–2357. 10.1016/j.chemosphere.2006.04.084.
- Hembrock-Heger, A., Nießner, M., Reupert, R., 2011. Tierarzneimittel in landwirtschaftlich genutzten Böden und oberflächennahem Grundwasser in Nordrhein-Westfalen. *Bodenschutz*, 109–113.
- Henkelmann, G., Meyer zu Köcker, K., Koch, K., Lebuhn, M., Effenberger, M., Bayer, K., 2018. Marktübersicht: Zusatz- und Hilfsstoffe in Biogasanlagen, Stand Januar 2018. *Biogas Forum Bayern*, 1–43.
- Herklotz, P.A., Gurung, P., Vanden Heuvel, B., Kinney, C.A., 2010. Uptake of human pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions. *Chemosphere* 78, 1416–1421. 10.1016/j.chemosphere.2009.12.048.
- Heuer, H., Schmitt, H., Smalla, K., 2011. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology* 14, 236–243. 10.1016/j.mib.2011.04.009.
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., Jaillard, B., 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil* 248, 43–59. 10.1023/A:1022371130939.
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.-L., 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment* 225, 109–118. 10.1016/S0048-9697(98)00337-4.
- Höck, M., Ziesing, S., 2016. Tetracycline (Doxycyclin) und Glycylcycline, In: Suerbaum et al. (Hg.) 2016 – Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 749–751. 10.1007/978-3-662-48678-8_100.
- Holling, C.S., Bailey, J.L., Vanden Heuvel, B., Kinney, C.A., 2012. Uptake of human pharmaceuticals and personal care products by cabbage (*Brassica campestris*) from fortified and biosolids-amended soils. *Journal of Environmental Monitoring* 14, 3029–3036. 10.1039/c2em30456b.
- Holm-Nielsen, J.B., Al Seadi, T., Oleskiewicz-Popiel, P., 2009. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresource Technology* 100, 5478–5484. 10.1016/j.biortech.2008.12.046.
- Holten Lützhøft, H.-C., Vaes, W.H.J., Freidig, A.P., Halling-Sørensen, B., Hermens, J.L.M., 2000. 1-Octanol/water distribution coefficient of oxolinic acid: Influence of pH and its relation to the interaction with dissolved organic carbon. *Chemosphere* 40, 711–714. 10.1016/S0045-6535(99)00441-5.
- Höper, H., Hamscher, G., Pawelzick, H.T., Schäfer, W., Nau, H., 2003. Occurrence and fate of tetracyclines and sulfonamides in soils fertilized with animal manure. *Proceedings of the Workshop: Diffuse input of chemicals into soil and ground water*. Dresden, pp. 117–124.
- Höper, H., Kues, J., Nau, H., Hamscher, G., 2002. *Bodenschutz: Erhaltung, Nutzung und Wiederherstellung von Böden*; Organ des BVB; Berlin: Schmidt, 7, 141–148.
- Hu, X., Luo, Y., Zhou, Q., 2010a. Simultaneous analysis of selected typical antibiotics in manure by microwave-assisted extraction and LC–MS. *Chromatographia* 71, 217–223. 10.1365/s10337-009-1438-8.
- Hu, X., Zhou, Q., Luo, Y., 2010b. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environmental Pollution* 158, 2992–2998. 10.1016/j.envpol.2010.05.023.
- Hu, Z., Liu, Y., Chen, G., Gui, X., Chen, T., Zhan, X., 2011. Characterization of organic matter degradation during composting of manure–straw mixtures spiked with tetracyclines. *Bioresource Technology* 102, 7329–7334. 10.1016/j.biortech.2011.05.003.
- Huang, Y., Cheng, M., Li, W., Wu, L., Chen, Y., Luo, Y., Christie, P., Zhang, H., 2013. Simultaneous extraction of four classes of antibiotics in soil, manure and sewage sludge and analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with the isotope-labelled internal standard method. *Analytical Methods* 5, 3721–3731. 10.1039/c3ay40220g.
- Huber, C., Bartha, B., Harpaintner, R., Schröder, P., 2009. Metabolism of acetaminophen (paracetamol) in plants - Two independent pathways result in the formation of a glutathione and a glucose conjugate. *Environmental Science and Pollution Research International* 16, 206–213. 10.1007/s11356-008-0095-z.
- Huber, C., Bartha, B., Schröder, P., 2012. Metabolism of diclofenac in plants - Hydroxylation is followed by glucose conjugation. *Journal of Hazardous Materials* 243, 250–256. 10.1016/j.jhazmat.2012.10.023.
- INESSS, 2009. Dosage guidelines for commonly used antibiotics in adults. <https://inesss.qc.ca/en.html>. Accessed June 2018.
- Ingerslev, F., Halling-Sørensen, B., 2000. Biodegradability properties of sulfonamides in activated sludge. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 2467–2473. 10.1897/1551-5028(2000)019<2467:BPOSIA>2.3.CO;2.
- Insam, H., Gómez-Brandón, M., Ascher, J., 2015. Manure-based biogas fermentation residues – Friend or foe of soil fertility? *Soil Biology and Biochemistry* 84, 1–14. 10.1016/j.soilbio.2015.02.006.
- Jacobsen, A.M., Halling-Sørensen, B., 2006. Multi-component analysis of tetracyclines, sulfonamides and tylosin in swine manure by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 384, 1164–1174. 10.1007/s00216-005-0261-9.
- Jacobsen, A.M., Halling-Sørensen, B., Ingerslev, F., Honoré Hansen, S., 2004. Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1038, 157–170. 10.1016/j.chroma.2004.03.034.
- Jacobsen, P., Berglind, L., 1988. Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms. *Aquaculture* 70, 365–370. 10.1016/0044-8486(88)90120-2.
- JECFA, 1995. Joint FAO / WHO expert Committee on Food Additives: Forty-second report of the Joint FAO / WHO expert committee on food additives: Sulfadimidin.

- Jechalke, S., Heuer, H., Siemens, J., Amelung, W., Smalla, K., 2014. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology* 22, 536–545. 10.1016/j.tim.2014.05.005.
- Jørgensen, S.E., Halling-Sørensen, B., 2000. Drugs in the environment. *Chemosphere* 40, 691–699. 10.1016/S0045-6535(99)00438-5.
- Kahle, M., Stamm, C., 2007a. Sorption of the veterinary antimicrobial sulfathiazole to organic materials of different origin. *Environmental Science & Technology* 41, 132–138. 10.1021/es061198b.
- Kahle, M., Stamm, C., 2007b. Time and pH-dependent sorption of the veterinary antimicrobial sulfathiazole to clay minerals and ferrihydrite. *Chemosphere* 68, 1224–1231. 10.1016/j.chemosphere.2007.01.061.
- Kang, D.H., Gupta, S., Rosen, C., Fritz, V., Singh, A., Chander, Y., Murray, H., Rohwer, C., 2013. Antibiotic uptake by vegetable crops from manure-applied soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 9992–10001. 10.1021/jf404045m.
- Kay, P., Blackwell, P.A., Boxall, A.B.A., 2004. Fate of veterinary antibiotics in a macroporous tile drained clay soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1136. 10.1897/03-374.
- Kay, P., Blackwell, P.A., Boxall, A.B.A., 2005. Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land. *Chemosphere* 59, 951–959. 10.1016/j.chemosphere.2004.11.055.
- Kelley, T.R., Pancorbo, O.C., Merka, W.C., Barnharts, H.M., 1998. Antibiotic resistance of bacterial litter isolates. *Poultry Science*, 243–247.
- Kemper, N., 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators* 8, 1–13. 10.1016/j.ecolind.2007.06.002.
- Keweloh, H., 2008. *Mikroorganismen in Lebensmitteln: Theorie und Praxis der Lebensmittelhygiene*, 2nd ed. Fachbuchverlag Pfanneberg GmbH & Co. KG, Haan-Gruiten.
- Kim, K.-R., Owens, G., Ok, Y.S., Park, W.-K., Lee, D.B., Kwon, S.-I., 2012. Decline in extractable antibiotics in manure-based composts during composting. *Waste Management (New York, N.Y.)* 32, 110–116. 10.1016/j.wasman.2011.07.026.
- Knapp, C.W., Dolfing, J., Ehlert, P.A.I., Graham, D.W., 2010. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environmental Science & Technology* 44, 580–587. 10.1021/es901221x.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: A national reconnaissance. *Environmental Science & Technology* 36, 1202–1211. 10.1021/es011055j.
- Kong, W.D., Zhu, Y.G., Liang, Y.C., Zhang, J., Smith, F.A., Yang, M., 2007. Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental Pollution* 147, 187–193. 10.1016/j.envpol.2006.08.016.
- Krapac, I.G., Koike, S., Meyer, M.T., Snow, D.D., Chou, S.F.J., Mackie, R.I., Roy, W.R., Chee-Standford, J.C., 2005. Long-term monitoring of the occurrence of antibiotic residues and antibiotic resistance in groundwater near swine confinement facilities. Report of the CSREES Project 2001-35102-10774.
- Kreuzig, R., Hölte, S., 2005. Investigations on the fate of sulfadiazine in manured soil: Laboratory experiments and test plot studies. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 771–776. 10.1897/03-582R.1.
- Kreuzig, R., Hölte, S., Stein, F., Batarseh, M. (Eds.), 2007. Zum Rückstandsverhalten von Veterinärpharmaka in Gülle und Boden - Eine Herausforderung an Labortestsysteme. Erschienen in "Tierarzneimittel in der Umwelt". Oldenbourg Industrieverlag, München.
- Kreuzig, R., Kullmer, C., Matthies, B., Plaga, B., Dieckmann, H., Hölte, S., 2005. Verhalten von in der Umwelt vorkommenden Pharmaka und ihren Metaboliten in Modelltestsystemen: Modellsystem Boden. Umweltbundesamt, 1–130.
- Kroger, 1983. Aspekte zur Ausscheidung antimikrobiell wirksamer Substanzen nach der chemotherapeutischen Behandlung von Nutztieren. *Wissenschaft und Umwelt*, 305–308.
- Kromidas, S., 2016. *The HPLC expert: Possibilities and limitations of modern high performance liquid chromatography*. Wiley-VCH, Weinheim, 378 pp.
- Kromidas, S., Morkowski, J.S., 2011. *Validierung in der Analytik*, 2nd ed. Wiley-VCH, Weinheim, 341 pp.
- Kues, J., Höper, H., Pawelzick, H.T., Pluquet, E., Hamscher, G., 2004. Einträge potenzieller Schadstoffe in den Boden über Wirtschaftsdünger. Wirkung auf Bodenorganismen und Verlagerung. Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen, 55–62.
- Kühne, M., Hamscher, G., Körner, U., Schedl, D., Wenzel, S., 2001. Formation of anhydrotetracycline during a high-temperature treatment of animal-derived feed contaminated with tetracycline. *Food Chemistry* 75, 423–429. 10.1016/S0308-8146(01)00230-8.
- Kühne, M., Ihnen, D., Möller, G., Agthe, O., 2000. Stability of tetracycline in water and liquid manure. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 47, 379–384. 10.1046/j.1439-0442.2000.00300.x.
- Kulshrestha, P., Giese, R.F., Aga, D.S., 2004. Investigating the molecular interactions of oxytetracycline in clay and organic matter: Insights on factors affecting its mobility in soil. *Environmental Science & Technology* 38, 4097–4105. 10.1021/es034856q.
- Kumar, K., C. Gupta, S., Chander, Y., Singh, A.K., 2005a. Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Advances in Agronomy* 87, 1–54. 10.1016/S0065-2113(05)87001-4.
- Kumar, K., Gupta, S.C., 2016. A framework to predict uptake of trace organic compounds by plants. *Journal of Environmental Quality* 45, 555–564. 10.2134/jeq2015.06.0261.
- Kumar, K., Gupta, S.C., Baidoo, S.K., Chander, Y., Rosen, C.J., 2005b. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *Journal of Environmental Quality* 34, 2082–2085. 10.2134/jeq2005.0026.
- Kumar, K., Thompson, A., Singh, A.K., Chander, Y., Gupta, S.C., 2004. Enzyme-linked immunosorbent assay for ultratrace determination of antibiotics in aqueous samples. *Journal of Environment Quality* 33, 250–256. 10.2134/jeq2004.0250.
- Kümmerer, K., 2004. *Pharmaceuticals in the environment: Sources, fate, effects and risks*. Springer Berlin Heidelberg, 534 pp.
- Kümmerer, K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. *Chemosphere* 75, 417–434. 10.1016/j.chemosphere.2008.11.086.

- Kurwadkar, S., Struckhoff, G., Pugh, K., Singh, O., 2017. Uptake and translocation of sulfamethazine by alfalfa grown under hydroponic conditions. *Journal of Environmental Sciences (China)* 53, 217–223. 10.1016/j.jes.2016.04.019.
- Kurwadkar, S.T., Adams, C.D., Meyer, M.T., Kolpin, D.W., 2011. Comparative mobility of sulfonamides and bromide tracer in three soils. *Journal of Environmental Management* 92, 1874–1881. 10.1016/j.jenvman.2011.03.018.
- Küster, A., Lehmann, S., Hein, A., Schönfeld, J., 2013. Antibiotika in der Umwelt – Wirkung mit Nebenwirkung. UMID: Umwelt und Mensch Informationsdienst, 18–28.
- Lallai, A., Mura, G., Onnis, N., 2002. The effects of certain antibiotics on biogas production in the anaerobic digestion of pig waste slurry. *Bioresource Technology* 82, 205–208. 10.1016/S0960-8524(01)00162-6.
- Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen, 2012. Kontrolle der Düngeverordnung. <http://www.landwirtschaftskammer.de/landwirtschaft/ackerbau/pdf/du-ev-owi-cc.pdf>. Accessed June 2018.
- Langhammer, J.-P., 1989. Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe als Rückstände in Gülle und im landwirtschaftlichen Umfeld. Dissertation, Bonn.
- LANUV, 2007. Eintrag von Arzneimitteln und deren Verhalten und Verbleib in der Umwelt: Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen - Fachbericht 2.
- Le Bizec, B., Pinel, G., Antignac, J.-P., 2009. Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 8016–8034. 10.1016/j.chroma.2009.07.007.
- Lehmann, S., Schönfeld, J., 2015. Antibiotikaresistenzen in der Umwelt: Fortbildung für den Öffentlichen Gesundheitsdienst 2015. Umweltbundesamt, 25 March 2015, Berlin.
- Le-Minh, N., Stuetz, R.M., Khan, S.J., 2012. Determination of six sulfonamide antibiotics, two metabolites and trimethoprim in wastewater by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Talanta* 89, 407–416. 10.1016/j.talanta.2011.12.053.
- Lertpaitoonpan, W., Ong, S.K., Moorman, T.B., 2009. Effect of organic carbon and pH on soil sorption of sulfamethazine. *Chemosphere* 76, 558–564. 10.1016/j.chemosphere.2009.02.066.
- Li, X., Yu, H., Xu, S., Hua, R., 2013. Uptake of three sulfonamides from contaminated soil by pakchoi cabbage. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 92, 297–302. 10.1016/j.ecoenv.2013.03.010.
- Lin, K., Gan, J., 2011. Sorption and degradation of wastewater-associated non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics in soils. *Chemosphere* 83, 240–246. 10.1016/j.chemosphere.2010.12.083.
- Lindsey, M.E., Meyer, M., Thurman, E.M., 2001. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 73, 4640–4646. 10.1021/ac010514w.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 2012. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, 4–17. 10.1016/j.addr.2012.09.019.
- Liu, R., He, P., Li, Z., Li, R., 2011. Simultaneous determination of 16 sulfonamides in animal feeds by UHPLC-MS-MS. *Journal of Chromatographic Science* 49, 640–646. 10.1093/chrs/49.8.640.
- Liu, Y., Liu, X., Dong, W., Zhang, L., Kong, Q., Wang, W., 2017. Efficient adsorption of sulfamethazine onto modified activated carbon: A plausible adsorption mechanism. *Scientific Reports* 7, 12437. 10.1038/s41598-017-12805-6.
- Loftin, K.A., Henny, C., Adams, C.D., Surampali, R., Mormile, M.R., 2005. Inhibition of microbial metabolism in anaerobic lagoons by selected sulfonamides, tetracyclines, lincomycin, and tylosin tartrate. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 782. 10.1897/04-093R.1.
- Loke, M.-L., Jespersen, S., Vreeken, R., Halling-Sørensen, B., Tjørnelund, J., 2003. Determination of oxytetracycline and its degradation products by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in manure-containing anaerobic test systems. *Journal of Chromatography B* 783, 11–23. 10.1016/S1570-0232(02)00468-3.
- Loke, M.-L., Tjørnelund, J., Halling-Sørensen, B., 2002. Determination of the distribution coefficient ($\log K_d$) of oxytetracycline, tylosin A, olaquinox and metronidazole in manure. *Chemosphere* 48, 351–361. 10.1016/S0045-6535(02)00078-4.
- López-Serna, R., Jurado, A., Vázquez-Suné, E., Carrera, J., Petrovic, M., Barceló, D., 2013. Occurrence of 95 pharmaceuticals and transformation products in urban groundwaters underlying the metropolis of Barcelona, Spain. *Environmental Pollution* 174, 305–315. 10.1016/j.envpol.2012.11.022.
- Löscher, W., Richter, A. (Eds.), 2016. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin: Begründet von Hans-Hasso Frey und Wolfgang Löscher*, 4th ed. Enke Verlag in Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- Lunestad, B.T., Goksøyr, J., 1990. Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in sea water by complex formation with magnesium and calcium. *Diseases of Aquatic Organisms* 9, 67–72.
- Luo, Y., Mao, D., Rysz, M., Zhou, Q., Zhang, H., Xu, L., J J Alvarez, P., 2010. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. *Environmental Science & Technology* 44, 7220–7225. 10.1021/es100233w.
- Malchi, T., Maor, Y., Tadmor, G., Shenker, M., Chefetz, B., 2014. Irrigation of root vegetables with treated wastewater: Evaluating uptake of pharmaceuticals and the associated human health risks. *Environmental Science & Technology* 48, 9325–9333. 10.1021/es5017894.
- Marschner, H., Römheld, V., Horst, W.J., Martin, P., 1986. Root-induced changes in the rhizosphere: Importance for the mineral nutrition of plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 149, 441–456. 10.1002/jpln.19861490408.
- Martin, S.R., 1979. Equilibrium and kinetic studies on the interaction of tetracyclines with calcium and magnesium. *Biophysical Chemistry* 10, 319–326. 10.1016/0301-4622(79)85019-X.
- Martínez-Carballo, E., González-Barreiro, C., Scharf, S., Gans, O., 2007. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution* 148, 570–579. 10.1016/j.envpol.2006.11.035.
- Massé, D.I., Lu, D., Masse, L., Droste, R.L., 2000. Effect of antibiotics on psychrophilic anaerobic digestion of swine manure slurry in sequencing batch reactors. *Bioresource Technology* 75, 205–211. 10.1016/S0960-8524(00)00046-8.

- Mathews, S., Reinhold, D., 2013. Biosolid-borne tetracyclines and sulfonamides in plants. *Environmental Science and Pollution Research International* 20, 4327–4338. 10.1007/s11356-013-1693-y.
- Max Rubner-Institut, 2013. Nationale Verzehrsstudie II: Lebensmittelverzehr und Nährstoffzufuhr auf Basis von 24h-Recalls. https://www.mri.bund.de/fileadmin/MRI/Institute/EV/Lebensmittelverzehr_Naehrstoffzufuhr_24h_recalls-neu.pdf. Accessed June 2018.
- Mc Farlane, J.C., 1994. Anatomy and physiology of plant conductive systems. In: Trapp S., Mc Farlane J. C., editors. *Plant contamination: Modeling and simulation of organic chemical processes*. Boca Raton (FL): CRC Press, p. 13-36.
- McIlvaine, T.C., 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Chemistry*, 183–186.
- Meena, V.D., Dotaniya, M, L., J, Saha, K., Patra, A, K., 2015. Antibiotics and antibiotic resistant bacteria in wastewater: Impact on environment, soil microbial activity and human health. *African Journal of Microbiology Research* 9, 965–978. 10.5897/AJMR2015.7195.
- Menz, V., Rümmele, S., 2015. DBU-Fachinfo - Arzneimittelrückstände in der Umwelt: Vom Erkennen zum vorsorgenden Handeln. Deutsche Bundesstiftung Umwelt.
- Meyer, M.T., Bumgarner, J.E., Varns, J.L., Daughtridge, J.V., Thurman, E.M., Hostetler, K.A., 2000. Use of radioimmunoassay as a screen for antibiotics in confined animal feeding operations and confirmation by liquid chromatography/mass spectrometry. *Science of the Total Environment* 248, 181–187. 10.1016/S0048-9697(99)00541-0.
- Michellini, L., Meggio, F., Reichel, R., Thiele-Bruhn, S., Pitacco, A., Scattolin, L., Montecchio, L., Alberghini, S., Squartini, A., Ghisi, R., 2015. Sulfadiazine uptake and effects in common hazel (*Corylus avellana* L.). *Environmental Science and Pollution Research International* 22, 13362–13371. 10.1007/s11356-015-4560-1.
- Migliore, L., Brambilla, G., Casoria, P., Civitareale, C., Cozzolino, S., Gaudio, L., 1996. Effect of sulphadimethoxine contamination on barley (*Hordeum distichum* L., Poaceae, Liliopsida). *Agriculture, Ecosystems & Environment* 60, 121–128. 10.1016/S0167-8809(96)01090-0.
- Miller, E.L., Nason, S.L., Karthikeyan, K.G., Pedersen, J.A., 2016. Root uptake of pharmaceuticals and personal care product ingredients. *Environmental Science & Technology* 50, 525–541. 10.1021/acs.est.5b01546.
- Mitchell, S.M., Ullman, J.L., Teel, A.L., Watts, R.J., Frear, C., 2013. The effects of the antibiotics ampicillin, florfenicol, sulfamethazine, and tylosin on biogas production and their degradation efficiency during anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 149, 244–252. 10.1016/j.biortech.2013.09.048.
- Mitscher, L.A., 1978. *The chemistry of the tetracycline antibiotics*. Dekker, New York, 330 pp.
- Mohring, S.A.I., Strzysch, I., Fernandes, M.R., Kiffmeyer, T.K., Tuerk, J., Hamscher, G., 2009. Degradation and elimination of various sulfonamides during anaerobic fermentation: A promising step on the way to sustainable pharmacy? *Environmental Science & Technology* 43, 2569–2574. 10.1021/es802042d.
- Motoyama, M., Nakagawa, S., Tanoue, R., Sato, Y., Nomiya, K., Shinohara, R., 2011. Residues of pharmaceutical products in recycled organic manure produced from sewage sludge and solid waste from livestock and relationship to their fermentation level. *Chemosphere* 84, 432–438. 10.1016/j.chemosphere.2011.03.048.
- Mückter, H., 2006. Antibiotika-Rückstände im Trinkwasser: 47. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene, Garmisch-Patenkirchen.
- Müller, S.R., Singer, H., Stoob, K., Burkhardt, M., Hartmann, N., Götz, C., Stamm, C., Waul, C., 2003. Occurrence and fate of antibiotics in manure, soil and water. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 574–578.
- Muxfeldt, H., 1962. Synthesen in der Tetracyclin-Reihe. *Angewandte Chemie* 74, 443–452. 10.1002/ange.19620741302.
- Nič, M., Jirát, J., Košata, B., Jenkins, A., McNaught, A., 2009. IUPAC: Compendium of chemical terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). IUPAC, Research Triangle Park, NC.
- Nieder, R., Benbi, D.K., Reichl, F.X. (Eds.), 2018. *Soil components and human health*. Springer Netherlands, Dordrecht, 907 pp.
- Oenema, O., Oudendag, D., Velthof, G.L., 2007. Nutrient losses from manure management in the European Union. *Livestock Science* 112, 261–272. 10.1016/j.livsci.2007.09.007.
- Oka, H., Ito, Y., Matsumoto, H., 2000. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A* 882, 109–133. 10.1016/S0021-9673(99)01316-3.
- Otto, M., 2006. *Analytische Chemie*, 3rd ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Pan, M., Chu, L.M., 2016. Adsorption and degradation of five selected antibiotics in agricultural soil. *The Science of the Total Environment* 545-546, 48–56. 10.1016/j.scitotenv.2015.12.040.
- Pan, M., Chu, L.M., 2017a. Fate of antibiotics in soil and their uptake by edible crops. *The Science of the Total Environment* 599-600, 500–512. 10.1016/j.scitotenv.2017.04.214.
- Pan, M., Chu, L.M., 2017b. Leaching behavior of veterinary antibiotics in animal manure-applied soils. *The Science of the Total Environment* 579, 466–473. 10.1016/j.scitotenv.2016.11.072.
- Pan, X., Qiang, Z., Ben, W., Chen, M., 2011. Residual veterinary antibiotics in swine manure from concentrated animal feeding operations in Shandong Province, China. *Chemosphere* 84, 695–700. 10.1016/j.chemosphere.2011.03.022.
- Paterson, S., Mackay, D., Tam, D., Shiu, W.Y., 1990. Uptake of organic chemicals by plants: A review of processes, correlations and models. *Chemosphere* 21, 297–331. 10.1016/0045-6535(90)90002-B.
- Pawelzick, H., 2005. Tierarzneimittel aus der Intensivtierhaltung als neue Umweltkontaminanten: Untersuchungen zu Eintrag und Verhalten verschiedener Antibiotika in der Umwelt mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie. Dissertation, Hannover, 190 pp.
- Pawelzick, H.T., Höper, H., Nau, H., Hamscher, G. (Eds.), 2004. A survey of the occurrence of various tetracyclines and sulfamethazine in sandy soils in northwestern Germany fertilized with liquid manure. Czech Republic: Prague.
- Pfeifer, T., Tuerk, J., Bester, K., Spiteller, M., 2002. Determination of selected sulfonamide antibiotics and trimethoprim in manure by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16, 663–669. 10.1002/rcm.624.

- Pfeiffer, 2017. Massenspektrometer und Restgasanalyse: Quadrupol-Massenspektrometer QMS. <https://www.pfeiffer-vacuum.com/de/know-how/massenspektrometer-und-restgasanalyse/quadrupol-massenspektrometer-qms/quadrupol-massensfilter/>. Accessed June 2018.
- Qiang, Z., Adams, C., 2004. Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water Research* 38, 2874–2890. 10.1016/j.watres.2004.03.017.
- Rabølle, M., Spliid, N.H., 2000. Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. *Chemosphere* 40, 715–722. 10.1016/S0045-6535(99)00442-7.
- Ratsak, C., Guhl, B., Zühlke, S., Delschen, T., 2013. Veterinärantibiotikarückstände in Gülle und Gärresten aus Nordrhein-Westfalen. *Environmental Sciences Europe* 25, 7. 10.1186/2190-4715-25-7.
- Reitz, M.U., Lamshöft, M., Mc Call, S., Ressler, H., Sur, R., Schriever, C., Webb, S., Zillgens, B., 2016. Effect of plant species and chemical substance properties on plant uptake: Poster presented at the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe 26 th Annual Meeting, 2016, Nantes.
- Richtlinie 2000/60/EG, 2000. Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik, 72 pp.
- Richtlinie 2001/82/EG, 2001. Richtlinie 2001/82/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. November 2001 zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Tierarzneimittel, 66 pp.
- Richtlinie 2006/118/EG, 2006. Richtlinie 2006/118/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. Dezember 2006 zum Schutz des Grundwassers vor Verschmutzung und Verschlechterung, 13 pp.
- Röder, R., Weiss, K., Sengl, M., 2007. Tierarzneimittel in der Umwelt. Oldenbourg Industrieverlag, München, 262 pp.
- Rodrigues-Lima, F., Dairou, J., Diaz, C.L., Rubio, M.C., Sim, E., Spaink, H.P., Dupret, J.-M., 2006. Cloning, functional expression and characterization of *Mesorhizobium loti* arylamine N-acetyltransferases: Rhizobial symbiosis supplies leguminous plants with the xenobiotic N-acetylation pathway. *Molecular Microbiology* 60, 505–512. 10.1111/j.1365-2958.2006.05114.x.
- Rogalski, W. (Ed.), 1985. Chemical modification of the tetracyclines. In: Hlavka J.J., Boothe J.H. (Eds.). *The tetracyclines. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 78. Springer Berlin Heidelberg.
- Rosendahl, I., Siemens, J., Groeneweg, J., Linzbach, E., Laabs, V., Herrmann, C., Vereecken, H., Amelung, W., 2011. Dissipation and sequestration of the veterinary antibiotic sulfadiazine and its metabolites under field conditions. *Environmental Science & Technology* 45, 5216–5222. 10.1021/es200326t.
- Rubert, K.F., Pedersen, J.A., 2006. Kinetics of oxytetracycline reaction with a hydrous manganese oxide. *Environmental Science & Technology* 40, 7216–7221. 10.1021/es060357o.
- Rückert, H., 2016. Grundwasserbeschaffenheit: Ausgewählte organische Spurenstoffe 2016. Hessisches Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Geologie - Jahresbericht 2016.
- S 0.0.0.0.012.04, 2016. Standardarbeitsanweisung des LHL - Bestimmung und Abschätzung der Messunsicherheit.
- Sacher, F., Lange, F.T., Brauch, H.-J., Blankenhorn, I., 2001. Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *Journal of Chromatography A* 938, 199–210. 10.1016/S0021-9673(01)01266-3.
- Samuelson, O.B., Torsvik, V., Ervik, A., 1992. Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance towards oxytetracycline in a fish farm sediment after medication. *Science of the Total Environment* 114, 25–36. 10.1016/0048-9697(92)90411-K.
- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65, 725–759. 10.1016/j.chemosphere.2006.03.026.
- Sattelberger, R., Gans, O., Martínez-Carballo, E., 2005. Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden. *Umweltbundesamt*, 1–103.
- Savric, I., 2001. Einflussfaktoren auf die Bindung und Mobilität organischer und anorganischer Stoffe in kontaminierten Rieselfeldböden. Dissertation, Technische Universität Berlin, 189 pp.
- Scheffer, F., Schachtschabel, P., Blume, H.-P., Brümmer, G.W., Horn, R., Kandeler, E., Kögel-Knabner, I., Kretzschmar, R., Stahr, K., Thiele-Bruhn, S., Welp, G., Wilke, B.-M. (Eds.), 2010. *Lehrbuch der Bodenkunde*, 16th ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Schlüsener, M.P., Spiteller, M., Bester, K., 2003. Determination of antibiotics from soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1003, 21–28. 10.1016/S0021-9673(03)00737-4.
- Schopfer, P., Brennicke, A., 2010. *Pflanzenphysiologie*, 7th ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 709 pp.
- Schramm, E., Völker, C., Walz, A., 2017. Tierarzneimittel und Umwelt: Schutzziele im Widerstreit der Interessen. http://www.kritischer-agrarbericht.de/fileadmin/Daten-KAB/KAB-2017/KAB_2017_243_247_Schramm_et_al.pdf. Accessed June 2018.
- Schwarz, J., Thiele-Bruhn, S., Eckhardt, K.-U., Schulten, H.-R., 2012. Sorption of sulfonamide antibiotics to soil organic sorbents: Batch experiments with model compounds and computational chemistry. *ISRN Soil Science* 2012, 1–10. 10.5402/2012/159189.
- Schwarz, L., 2014. Transformation von Tierarzneimitteln und Bioziden in Gülle - Eine Literaturstudie. *Texte* 56/2014. Umweltbundesamt, 1–108.
- Selvam, A., Wong, J.W.C. (Eds.), 2017. Chapter 12 - Degradation of antibiotics in livestock manure during composting: In: *Current developments in biotechnology and bioengineering; solid waste management*; pp. 267-292. Elsevier.
- Selvam, A., Zhao, Z., Wong, J.W.C., 2012. Composting of swine manure spiked with sulfadiazine, chlortetracycline and ciprofloxacin. *Bioresource Technology* 126, 412–417. 10.1016/j.biortech.2011.12.073.

- Seol, Y., Lee, L.S., 2000. Effect of dissolved organic matter in treated effluents on sorption of atrazine and prometryn by soils. *Soil Science Society of America Journal* 64, 1976. 10.2136/sssaj2000.6461976x.
- Shelver, W.L., Varel, V.H., 2012. Development of a UHPLC-MS/MS method for the measurement of chlortetracycline degradation in swine manure. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402, 1931–1939. 10.1007/s00216-011-5637-4.
- Shen, G., Zhang, Y., Hu, S., Zhang, H., Yuan, Z., Zhang, W., 2018. Adsorption and degradation of sulfadiazine and sulfamethoxazole in an agricultural soil system under an anaerobic condition: Kinetics and environmental risks. *Chemosphere* 194, 266–274. 10.1016/j.chemosphere.2017.11.175.
- Sithole, B.B., Guy, R.D., 1987. Models for tetracycline in aquatic environments. *Water, Air, & Soil Pollution* 32, 303–314. 10.1007/BF00225116.
- Slana, M., Dolenc, M.S., 2013. Environmental risk assessment of antimicrobials applied in veterinary medicine-A field study and laboratory approach. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 35, 131–141. 10.1016/j.etap.2012.11.017.
- Smith, D.L., Harris, A.D., Johnson, J.A., Silbergeld, E.K., Morris, J.G., 2002. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 6434–6439. 10.1073/pnas.082188899.
- Søeborg, T., Ingerslev, F., Halling-Sørensen, B., 2004. Chemical stability of chlortetracycline and chlortetracycline degradation products and epimers in soil interstitial water. *Chemosphere* 57, 1515–1524. 10.1016/j.chemosphere.2004.09.020.
- Spilmeyer, A., Ahlborn, J., Hamscher, G., 2014. Simultaneous determination of 14 sulfonamides and tetracyclines in biogas plants by liquid-liquid-extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406, 2513–2524. 10.1007/s00216-014-7649-3.
- Spilmeyer, A., Breier, B., Großmeier, K., Hamscher, G., 2015. Elimination patterns of worldwide used sulfonamides and tetracyclines during anaerobic fermentation. *Bioresource Technology* 193, 307–314. 10.1016/j.biortech.2015.06.081.
- Spilmeyer, A., Höper, H., Hamscher, G., 2017a. Long-term monitoring of sulfonamide leaching from manure amended soil into groundwater. *Chemosphere* 177, 232–238. 10.1016/j.chemosphere.2017.03.020.
- Spilmeyer, A., Stahl, F., Petri, M.S., Zerr, W., Brunn, H., Hamscher, G., 2017b. Transformation of sulfonamides and tetracyclines during anaerobic fermentation of liquid manure. *Journal of Environmental Quality* 46, 160–168. 10.2134/jeq2016.04.0152.
- Srinivasan, P., Sarmah, A.K., Manley-Harris, M., 2013. Co-contaminants and factors affecting the sorption behaviour of two sulfonamides in pasture soils. *Environmental Pollution* 180, 165–172. 10.1016/j.envpol.2013.05.022.
- Srinivasan, P., Sarmah, A.K., Manley-Harris, M., 2014. Sorption of selected veterinary antibiotics onto dairy farming soils of contrasting nature. *The Science of the Total Environment* 472, 695–703. 10.1016/j.scitotenv.2013.11.104.
- Steinhilber, D., Schubert-Zsilavecz, M., J. J., R., 2005. *Medizinische Chemie – Targets und Arzneistoffe: Kapitel 13: Wirkstoffe gegen bakterielle Infektionen*. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart.
- Stephens, C.R., Murai, K., Brunings, K.J., Woodward, R.B., 1956. Acidity constants of the tetracycline antibiotics, 4155–4158. 10.1021/ja01597a081.
- Stevens, H., 2009. *Untersuchungen zum Verhalten von Veterinärpharmaka im Boden*. Dissertation, Universität Paderborn, 231 pp.
- Stoob, K., Singer, H.P., Stettler, S., Hartmann, N., Mueller, S.R., Stamm, C.H., 2006. Exhaustive extraction of sulfonamide antibiotics from aged agricultural soils using pressurized liquid extraction. *Journal of Chromatography A* 1128, 1–9. 10.1016/j.chroma.2006.06.048.
- Storteboom, H., Arabi, M., Davis, J.G., Crimi, B., Pruden, A., 2010. Identification of antibiotic-resistance-gene molecular signatures suitable as tracers of pristine river, urban, and agricultural sources. *Environmental Science & Technology* 44, 1947–1953. 10.1021/es902893f.
- Szatmári, I., Laczay, P., Borbély, Z., 2011. Degradation of doxycycline in aged pig manure. *Acta Veterinaria Hungarica* 59, 1–10. 10.1556/AVet.59.2011.1.1.
- Tagesschau, 2018. *Multiresistente Keime in deutschen Bächen, Flüssen und Badeseen*. <http://www.tagesschau.de/inland/keime-103.html>. Accessed 6 February 2018.
- Tasho, R.P., Cho, J.Y., 2016. Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review. *The Science of the Total Environment* 563-564, 366–376. 10.1016/j.scitotenv.2016.04.140.
- ter Laak, T.L., Gebbink, W.A., Tolls, J., 2006. The effect of pH and ionic strength on the sorption of sulfachloropyridazine, tylosin, and oxytetracyclin to soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 904. 10.1897/05-232R.1.
- Tetzner, N.F., Maniero, M.G., Rodrigues-Silva, C., Rath, S., 2016. On-line solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a powerful technique for the determination of sulfonamide residues in soils. *Journal of chromatography. A* 1452, 89–97. 10.1016/j.chroma.2016.05.034.
- Thiele, S., 2000. Adsorption of the antibiotic pharmaceutical compound sulfapyridine by a long-term differently fertilized loess Chernozem. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 163, 589–594. 10.1002/1522-2624(200012)163:6<589:AID-JPLN589>3.0.CO;2-5.
- Thiele-Bruhn, S., 2003. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 166, 145–167. 10.1002/jpln.200390023.
- Thiele-Bruhn, S., Aust, M.-O., 2004. Effects of pig slurry on the sorption of sulfonamide antibiotics in soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 47, 31–39. 10.1007/s00244-003-3120-8.
- Thiele-Bruhn, S., Beck, I.-C., 2005. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere* 59, 457–465. 10.1016/j.chemosphere.2005.01.023.
- Thiele-Bruhn, S., Peters, D., 2007. Photodegradation of pharmaceutical antibiotics on slurry and soil surfaces. *Landbauforschung Völkenrode*, 13–23.
- Thiele-Bruhn, S., Seibicke, T., Schulten, H.-R., Leinweber, P., 2004. Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. *Journal of Environment Quality* 33, 1331. 10.2134/jeq2004.1331.

- Thurman, E.M., Lindsey, M.E. (Eds.), 2000. Transport of antibiotics in soil and their potential for groundwater contamination, pp. 22-25.
- Tolls, J., 2001. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. *Environmental Science & Technology* 35, 3397–3406. 10.1021/es0003021.
- Trapp, S., 2000. Modelling uptake into roots and subsequent translocation of neutral and ionisable organic compounds. *Pest Management Science* 56, 767–778. 10.1002/1526-4998(200009)56:9<767:AID-PS198>3.3.CO;2-H.
- Trapp, S., 2004. Plant uptake and transport models for neutral and ionic chemicals. *Environmental Science and Pollution Research* 11, 33–39. 10.1065/espr2003.08.169.
- Trapp, S., Legind, C.N., 2011. Uptake of organic contaminants from soil into vegetables and fruits. In: Swartjes F. (eds) *Dealing with contaminated sites*. Springer, Dordrecht 2011, 369–408. 10.1007/978-90-481-9757-6_9.
- Travis, C.C., Arms, A.D., 1988. Bioconcentration of organics in beef, milk, and vegetation. *Environmental Science & Technology* 22, 271–274. 10.1021/es00168a005.
- TrinkwV, 2018. Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch - Trinkwasserverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 10. März 2016 (BGBl. I S. 459), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 3. Januar 2018 (BGBl. I S. 99) geändert worden ist, 45 pp.
- UBA, 2003. Bewertung der Anwesenheit teil- oder nicht bewertbarer Stoffe im Trinkwasser aus gesundheitlicher Sicht: Empfehlung des Umweltbundesamtes nach Anhörung der Trinkwasserkommission beim Umweltbundesamt. https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/374/dokumente/gow-empfehlung_2003_46.pdf. Accessed June 2018.
- van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A., Laxminarayan, R., 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 5649–5654. 10.1073/pnas.1503141112.
- Varel, V.H., Wells, J.E., Shelver, W.L., Rice, C.P., Armstrong, D.L., Parker, D.B., 2012. Effect of anaerobic digestion temperature on odour, coliforms and chlortetracycline in swine manure or monensin in cattle manure. *Journal of Applied Microbiology* 112, 705–715. 10.1111/j.1365-2672.2012.05250.x.
- VGH Baden Württemberg, 2013. Urteil vom 20. Juni 2013 - Az. 9 S 2883/11. <https://openjur.de/u/639754.html>. Accessed June 2018.
- VO (EG) Nr. 1831/2003, 2003. Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung.
- VO (EG) Nr. 470/2009, 2009. Verordnung (EG) Nr. 470/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. Mai 2009 über die Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Rückstände pharmakologisch wirksamer Stoffe in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Änderung der Richtlinie 2001/82/EG des Europäischen Parlaments und des Rates und der Verordnung (EG) Nr. 726/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates.
- VO (EG) Nr. 834/2007, 2007. Verordnung (EG) Nr. 834/2007 des Rates vom 28. Juni 2007 über die ökologische/biologische Produktion und die Kennzeichnung von ökologischen/biologischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 2092/91.
- VO (EU) Nr. 37/2010, 2010. Verordnung (EU) Nr 37/2010 der Kommission vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs.
- Vockel, A., 2005. Bestimmung von Chlortetracyclinrückständen in biologischen Proben aus der landwirtschaftlichen Tierhaltung mit HPLC-UV-MS/MS: Methodenentwicklung und Anwendung in Medikationsstudien. Dissertation, Universität Paderborn, 215 pp.
- Wallace, J.S., Aga, D.S., 2016. Enhancing extraction and detection of veterinary antibiotics in solid and liquid fractions of manure. *Journal of Environmental Quality* 45, 471–479. 10.2134/jeq2015.05.0246.
- Wallmann, J., Reimer, I., Heberer, T., 2016. Abgabemengenerfassung antimikrobiell wirksamer Stoffe in Deutschland 2015: Auswertung der nach DIMDI-AMV eingereichten Daten 2015 und Vergleich mit den Daten aus den Vorjahren. *Deutsches Tierärzteblatt (DTBl.)*, 1650–1657.
- Wang, H., Chu, Y., Fang, C., 2017. Occurrence of veterinary antibiotics in swine manure from large-scale feedlots in Zhejiang Province, China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 98, 472–477. 10.1007/s00128-017-2052-3.
- Wegst-Uhrich, S.R., Navarro, D.A., Zimmerman, L., Aga, D.S., 2014. Assessing antibiotic sorption in soil: A literature review and new case studies on sulfonamides and macrolides. *Chemistry Central Journal* 8, 5. 10.1186/1752-153X-8-5.
- Wehrhan, A., Streck, T., Groeneweg, J., Vereecken, H., Kasteel, R., 2010. Long-term sorption and desorption of sulfadiazine in soil: Experiments and modeling. *Journal of Environmental Quality* 39, 654–666. 10.2134/jeq2009.0001.
- Weiland, P., 2010. Biogas production: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85, 849–860. 10.1007/s00253-009-2246-7.
- Wessels, J.M., Ford, W.E., Szymczak, W., Schneider, S., 1998. The complexation of tetracycline and anhydrotetracycline with Mg^{2+} and Ca^{2+} : A spectroscopic study. *Journal of Physical Chemistry B* 102, 9323–9331. 10.1021/jp9824050.
- WHO, 2011. Critically important antimicrobials for human medicine (3rd Revision). <http://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-third/en/>. Accessed June 2018.
- Widyasari-Mehta, A., Hartung, S., Kreuzig, R., 2016a. From the application of antibiotics to antibiotic residues in liquid manures and digestates: A screening study in one European center of conventional pig husbandry. *Journal of Environmental Management* 177, 129–137. 10.1016/j.jenvman.2016.04.012.
- Widyasari-Mehta, A., Suwito, H.R.K.A., Kreuzig, R., 2016b. Laboratory testing on the removal of the veterinary antibiotic doxycycline during long-term liquid pig manure and digestate storage. *Chemosphere* 149, 154–160. 10.1016/j.chemosphere.2016.01.094.

- Winckler, C., Engels, H., Hund-Rinke, K., Luckow, T., Simon, M., Steffens, G., 2004. Verhalten von Tetracyclinen und anderen Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden. Wirkung von Tetracyclinen und anderen Tierarzneimitteln auf die Bodenfunktion. UFOPLAN 200 73 248. Im Auftrag des Umweltbundesamtes Berlin, pp. 1–157.
- Winckler, C., Grafe, A., 2000. Abschätzung des Stoffeintrags in Boden durch Tierarzneimittel und pharmakologisch wirksame Futterzusatzstoffe. Umweltbundesamt.
- Winckler, C., Grafe, A., 2001. Use of veterinary drugs in intensive animal production. *Journal of Soils and Sediments* 1, 66–70. 10.1007/BF02987711.
- Wise, R., 2002. Antimicrobial resistance: Priorities for action. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49, 585–586. 10.1093/jac/49.4.585.
- Wohde, M., Berkner, S., Junker, T., Konradi, S., Schwarz, L., Düring, R.-A., 2016. Occurrence and transformation of veterinary pharmaceuticals and biocides in manure: A literature review. *Environmental Sciences Europe* 28, 23. 10.1186/s12302-016-0091-8.
- Wolters, B., Widyasari-Mehta, A., Kreuzig, R., Smalla, K., 2016. Contaminations of organic fertilizers with antibiotic residues, resistance genes, and mobile genetic elements mirroring antibiotic use in livestock? *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 9343–9353. 10.1007/s00253-016-7742-y.
- Wong, J.W.-C., Tyagi, R.D., Pandey, A., 2017. *Current developments in biotechnology and bioengineering*. Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg, 504 pp.
- Wu, X., Dodgen, L.K., Conkle, J.L., Gan, J., 2015. Plant uptake of pharmaceutical and personal care products from recycled water and biosolids: A review. *The Science of the Total Environment* 536, 655–666. 10.1016/j.scitotenv.2015.07.129.
- Wu, X., Fu, Q., Gan, J., 2016. Metabolism of pharmaceutical and personal care products by carrot cell cultures. *Environmental Pollution* 211, 141–147. 10.1016/j.envpol.2015.12.050.
- Wu, X., Wei, Y., Zheng, J., Zhao, X., Zhong, W., 2011. The behavior of tetracyclines and their degradation products during swine manure composting. *Bioresource Technology* 102, 5924–5931. 10.1016/j.biortech.2011.03.007.
- Yang, C.-W., Hsiao, W.-C., Chang, B.-V., 2016. Biodegradation of sulfonamide antibiotics in sludge. *Chemosphere* 150, 559–565. 10.1016/j.chemosphere.2016.02.064.
- Yang, S., Cha, J., Carlson, K., 2004. Quantitative determination of trace concentrations of tetracycline and sulfonamide antibiotics in surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18, 2131–2145. 10.1002/rcm.1598.
- Zarfl, C., Klasmeier, J., Matthies, M., 2009. A conceptual model describing the fate of sulfadiazine and its metabolites observed in manure-amended soils. *Chemosphere* 77, 720–726. 10.1016/j.chemosphere.2009.08.035.
- Zessel, K., Mohring, S., Hamscher, G., Kietzmann, M., Stahl, J., 2014. Biocompatibility and antibacterial activity of photolytic products of sulfonamides. *Chemosphere* 100, 167–174. 10.1016/j.chemosphere.2013.11.038.
- Zhang, C., Feng, Y., Liu, Y., Chang, H.-q., Li, Z.-j., Xue, J.-m., 2017. Uptake and translocation of organic pollutants in plants: A review. *Journal of Integrative Agriculture* 16, 1659–1668. 10.1016/S2095-3119(16)61590-3.
- Zhang, H., Chen, W.-R., Huang, C.-H., 2008. Kinetic modeling of oxidation of antibacterial agents by manganese oxide. *Environmental Science & Technology* 42, 5548–5554. 10.1021/es703143g.
- Zhang, H., Du, M., Jiang, H., Zhang, D., Lin, L., Ye, H., Zhang, X., 2015. Occurrence, seasonal variation and removal efficiency of antibiotics and their metabolites in wastewater treatment plants, Jiulongjiang River Basin, South China. *Environmental Science. Processes & Impacts* 17, 225–234. 10.1039/c4em00457d.
- Zhang, L., Zhu, D., Wang, H., Hou, L., Chen, W., 2012. Humic acid-mediated transport of tetracycline and pyrene in saturated porous media. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 534–541. 10.1002/etc.1726.
- Zhang, R., Yang, Y., Huang, C.-H., Zhao, L., Sun, P., 2016. Kinetics and modeling of sulfonamide antibiotic degradation in wastewater and human urine by UV/H₂O₂ and UV/PDS. *Water Research* 103, 283–292. 10.1016/j.watres.2016.07.037.
- Zhang, Y., Xu, J., Zhong, Z., Guo, C., Li, L., He, Y., Fan, W., Chen, Y., 2013. Degradation of sulfonamides antibiotics in lake water and sediment. *Environmental Science and Pollution Research International* 20, 2372–2380. 10.1007/s11356-012-1121-8.
- Zhou, L.-J., Ying, G.-G., Liu, S., Zhang, R.-Q., Lai, H.-J., Chen, Z.-F., Pan, C.-G., 2013. Excretion masses and environmental occurrence of antibiotics in typical swine and dairy cattle farms in China. *The Science of the Total Environment* 444, 183–195. 10.1016/j.scitotenv.2012.11.087.
- Zhou, L.-J., Ying, G.-G., Liu, S., Zhao, J.-L., Chen, F., Zhang, R.-Q., Peng, F.-Q., Zhang, Q.-Q., 2012. Simultaneous determination of human and veterinary antibiotics in various environmental matrices by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1244, 123–138. 10.1016/j.chroma.2012.04.076.
- Zhou, W., Moore, D.E., 1994. Photochemical decomposition of sulfamethoxazole. *International Journal of Pharmaceutics* 110, 55–63. 10.1016/0378-5173(94)90375-1.
- Zhu, J., Snow, D.D., Cassada, D.A., Monson, S.J., Spalding, R.F., 2001. Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlor-tetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 928, 177–186. 10.1016/S0021-9673(01)01139-6.

8 Anhang

8.1 Anhang A zu Kapitel 1 „Einleitung“

Tabelle A-1: Nachgewiesene Tetracycline und Sulfonamide in Gülleproben verschiedener Monitoringstudien.

Antibiotikum	Tierart	Land	Maximalkonzentration / Konzentrationsbereich	Literaturangabe
Tetracycline				
Chlortetracyclin	Schwein	Deutschland	0,1 mg kg ⁻¹	(Hamscher et al., 2002)
Chlortetracyclin (n=176, 18 positiv)	Schwein	Deutschland	0,8 – 28 mg kg ⁻¹ (Median: 5,6 mg kg ⁻¹)	(Engels, 2004); (Winckler et al., 2004)
Chlortetracyclin (n=168, 26 positiv)	Schwein	Deutschland	0,8 – 331 mg kg ⁻¹ (Median: 4,4 mg kg ⁻¹)	(Engels, 2004)
Chlortetracyclin	Schwein	USA	0 – 5,2 mg L ⁻¹	(Kumar et al., 2004)
Chlortetracyclin (n=5, 2 positiv)	Schwein, (nach Fermentation)	Japan	280 µg kg ⁻¹	(Motoyama et al., 2011)
Chlortetracyclin (n=8, 1 positiv)	Rind (nach Fermentation)	Japan	1,3 µg kg ⁻¹	(Motoyama et al., 2011)
Chlortetracyclin	Schwein ^a	Großbritannien	112 mg kg ⁻¹	(Blackwell et al., 2005)
Chlortetracyclin (n=34, 7 positiv)	Schwein und Rind (aus Güllelagern)	Deutschland, NRW	3,6 mg kg ⁻¹	(Ratsak et al., 2013)
Chlortetracyclin	Schwein, Zuchtbetrieb	Deutschland	15,8 – 55,1 mg kg ⁻¹	(Widyasari-Mehta et al., 2016a)
Chlortetracyclin	Schwein, Mastbetrieb	Deutschland	1,7 – 46,3 mg kg ⁻¹	(Widyasari-Mehta et al., 2016a)
Chlortetracyclin	Schwein	Dänemark	15,7 mg kg ⁻¹	(Jacobsen and Halling-Sørensen, 2006)
Chlortetracyclin (n=30, 17 positiv)	Schwein	Österreich	0,1 – 46 mg kg ⁻¹	(Martínez-Carballo et al., 2007); (Sattlerberger et al., 2005)
Chlortetracyclin	Schwein	Zhejiang, China	0,36 – 57,95 mg kg ⁻¹	(Wang et al., 2017)
Doxycyclin	Schwein, Zuchtbetrieb	Deutschland	5 – 101 mg kg ⁻¹ (Median: 19,8 mg kg ⁻¹)	(Widyasari-Mehta et al., 2016a)
Doxycyclin	Schwein, Mastbetrieb	Deutschland	11 – 28,9 mg kg ⁻¹	(Widyasari-Mehta et al., 2016a)
Doxycyclin ^b	Schwein	Niederlande	95 mg kg ⁻¹	(Berendsen et al., 2015)
Doxycyclin ^b	Rind	Niederlande	0,2 mg kg ⁻¹	(Berendsen et al., 2015)
Epi-Chlortetracyclin	Schwein	Dänemark	14,1 mg kg ⁻¹	(Jacobsen and Halling-Sørensen, 2006)
Oxytetracyclin (n=30, 22 positiv)	Schwein	Österreich	0,21 – 29 mg kg ⁻¹	(Martínez-Carballo et al., 2007); (Sattlerberger et al., 2005)
Oxytetracyclin (n=176, 9 positiv)	Schwein	Deutschland	1,6 – 136,2 mg kg ⁻¹	(Engels, 2004); (Winckler et al., 2004)
Tetracyclin	Schwein	Deutschland	4 mg kg ⁻¹	(Hamscher et al., 2002)

^a Behandlung: 800 mg/kg über das Futter für 3 Tage; Alter: 6 Wochen, Analyse der Gülle direkt nach der Behandlung; ^b Probenahme erfolgte während der Schlachtophase aus dem Darm der Tiere

Tabelle A-2: Fortführung der Tabelle A-1.

Antibiotikum	Tierart	Land	Maximalkonzentration / Konzentrationsbereich	Literaturangabe
Tetracycline				
Tetracyclin und Chlortetracyclin	Schwein, Rind	Deutschland	0,1 – 45,3 mg/kg	(Hamscher et al., 2003a; Höper et al., 2002)
Tetracyclin (n=176, 87 positiv)	Schwein	Deutschland	0,9 – 46 mg kg ⁻¹	(Engels, 2004); (Winckler et al., 2004)
Tetracyclin (n=181, 43 positiv)	Schwein	Deutschland	0,6 – 66 mg L ⁻¹	(Winckler and Grafe, 2001)
Tetracyclin (n=30, 22 positiv)	Schwein	Österreich	0,36 – 23 mg kg ⁻¹ _{TM}	(Martínez-Carballo et al., 2007); (Sattelberger et al., 2005)
Tetracyclin (n=26, 23 positiv)	Gülle-Lagunen	Nebraska, USA	0,003 – 12 mg kg ⁻¹	(Zhu et al., 2001)
Tetracyclin (n=5, 3 positiv)	Schwein (nach Fermentation)	Japan	15 µg kg ⁻¹	(Motoyama et al., 2011)
Tetracyclin (n=8, 2 positiv)	Rind (nach Fermentation)	Japan	1,2 µg kg ⁻¹	(Motoyama et al., 2011)
Sulfonamide				
Sulfamethazin (n=34, 6 positiv)	Schwein und Rind (Güllelager)	Deutschland	7,04 mg kg ⁻¹ _{TM}	(Ratsak et al., 2013)
Sulfamethazin (n=30, 18 positiv)	Schwein	Österreich	< NG bis 20 mg kg ⁻¹ _{TM}	(Martínez-Carballo et al., 2007); (Sattelberger et al., 2005)
Sulfamethazin (n=176, 87 positiv)	Schwein	Deutschland	167 mg kg ⁻¹ (Median: 3,8 mg kg ⁻¹)	(Engels, 2004); (Winckler et al., 2004)
Sulfamethazin (n=168, 96 positiv)	Schwein	Deutschland	62,1 mg kg ⁻¹ (Median: 4,3 mg kg ⁻¹)	(Engels, 2004)
Sulfamethazin	Schwein	Zhejiang, China	0,38 – 37,32 mg kg ⁻¹ _{TM}	(Wang et al., 2017)
Sulfamethazin und Sulfadiazin	Schwein, Rind	Deutschland	2,9 mg kg ⁻¹	(Hamscher et al., 2003a; Höper et al., 2002)
N-Acetyl-SMZ (n=6, 5 positiv)	Schwein	Schweiz	0 – 2,6 mg kg ⁻¹ _{FM}	(Haller et al., 2002)
Sulfamethoxazol	Schwein	Zhejiang, China	0,05 – 9,35 mg kg ⁻¹ _{TM}	(Wang et al., 2017)
Sulfamethoxazol (n=30, 2 positiv)	Schwein	Österreich	< NG – 2,4 mg kg ⁻¹ _{TM}	(Martínez-Carballo et al., 2007); (Sattelberger et al., 2005)
Sulfamethoxazol (n=5, 4 positiv)	Schwein (nach Fermentation)	Japan	35 µg kg ⁻¹	(Motoyama et al., 2011)
Sulfamethoxazol (n=8, 1 positiv)	Rind (nach Fermentation)	Japan	10 µg kg ⁻¹	(Motoyama et al., 2011)
Sulfadiazin (n=4, 2 positiv)	Schwein	Deutschland	0,01 – 0,08 mg kg ⁻¹	(Pfeifer et al., 2002)
Sulfadiazin (n=176, 86 positiv)	Schwein	Deutschland	0,7 – 41,4 mg kg ⁻¹	(Engels, 2004); (Winckler et al., 2004)
N-Acetyl-Sulfadiazin (n=4, 2 positiv)	Schwein	Deutschland	0,01 – 0,27 mg kg ⁻¹	(Pfeifer et al., 2002)
Sulfathiazol (n=6, 5 positiv)	Schwein	Schweiz	0 – 12,4 mg kg ⁻¹ _{FM}	(Haller et al., 2002)

8.2 Anhang B zu Kapitel 4 „Ergebnisse“

Tabelle B-1: Antibiotikagehalte im Deutschen Weidelgras „Lemmos“ des Aufwuchsjahres 2014, welches auf Sandboden kultiviert wurde. Angegeben sind die Antibiotikagehalte in $\mu\text{g kg}^{-1}$ bezogen auf Frischmasse und Trockenmasse der einzelnen Ernteschnitte und Varianten. Als Ergebnis ist der arithmetische Mittelwert dreier Aufarbeitungen \pm die Standardabweichung aufgeführt. Die Spannweite der Messergebnisse ist in Klammern angegeben. Die Bestimmungsgrenze (BG) beträgt für alle Analyten $1 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Variante	Bodentyp	Analyt	Konz. dotiert [mg/kg Gülle]	Antibiotikagehalte im Weidelgras „Lemmos“ – Varianten mit Volkmarser Sandboden									
				1. Schnitt		2. Schnitt		3. Schnitt		4. Schnitt		5. Schnitt	
				$\mu\text{g kg}^{\text{FM}-1}$ \pm STDAW	$\mu\text{g kg}^{\text{FM}-1}$ \pm STDAW	$\mu\text{g kg}^{\text{FM}-1}$ \pm STDAW	$\mu\text{g kg}^{\text{FM}-1}$ \pm STDAW	$\mu\text{g kg}^{\text{FM}-1}$ \pm STDAW	$\mu\text{g kg}^{\text{FM}-1}$ \pm STDAW	$\mu\text{g kg}^{\text{FM}-1}$ \pm STDAW	$\mu\text{g kg}^{\text{FM}-1}$ \pm STDAW	$\mu\text{g kg}^{\text{FM}-1}$ \pm STDAW	$\mu\text{g kg}^{\text{FM}-1}$ \pm STDAW
5	Volkmarser Sandboden	CTC	100	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
8		DOX	100	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
11		SMX	100	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
12		SMZ	20	$1,8 \pm 0,2$ (1,7-2,0)	$15,4 \pm 1,4$ (14,2-17,0)	$1,0 \pm 0,1$ (0,9-1,1)	$10,4 \pm 1,1$ (9,4-11,5)	$1,0 \pm 0,1$ (0,9-1,1)	$6,6 \pm 0,5$ (6,1-7,0)	$0,9 \pm 0,5$ (< BG-1,5)	$5,6 \pm 3,0$ (3,0-8,8)	$2,4 \pm 0,2$ (2,2-2,6)	$4,7 \pm 0,4$ (4,6-5,1)
13		SMZ	50	$5,7 \pm 0,4$ (5,5-6,1)	$48,6 \pm 3,0$ (46,5-52,0)	$1,9 \pm 0,5$ (1,4-2,4)	$17,5 \pm 5,1$ (12,8-22,8)	$2,0 \pm 0,2$ (1,9-2,2)	$13,3 \pm 1,0$ (12,3-14,2)	$2,0 \pm 0,5$ (1,5-2,4)	$10,3 \pm 2,4$ (7,8-12,4)	$3,6 \pm 1,1$ (2,8-4,8)	$7,6 \pm 2,3$ (6,0-10,2)
14	SMZ	100	$24,9 \pm 1,5$ (23,2-26,1)	$217,9 \pm 5,1$ (197,4-221,5)	$9,3 \pm 1,4$ (7,7-10,4)	$95,5 \pm 3,5$ (72,7-98,0)	$5,5 \pm 0,8$ (4,6-6,1)	$34,8 \pm 5,0$ (29,2-38,7)	$5,3 \pm 0,7$ (4,5-5,8)	$28,3 \pm 5,0$ (24,8-31,8)	$8,7 \pm 0,8$ (7,8-9,3)	$24,3 \pm 2,1$ (21,8-25,8)	
Metaboliten													
12		N-Ac-SMZ		< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
13		N-Ac-SMZ		$3,0 \pm 0,1$ (3,0-3,2)	$25,9 \pm 0,8$ (25,3-26,8)	< BG/>NG $0,6 \pm 0,2$ (0,5-0,8)	< BG/>NG $5,9 \pm 1,5$ (4,9-7,6)	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
14		N-Ac-SMZ		$10,1 \pm 0,7$ (9,4-10,8)	$86,1 \pm 8,5$ (80,1-92,1)	$2,8 \pm 0,1$ (2,6-2,9)	$26,7 \pm 0,5$ (24,9-27,0)	$1,1 \pm 0,1$ (1,1)	$6,9 \pm 0,2$ (6,7-7,0)	$1,4 \pm 0,3$ (1,1-1,8)	$6,6 \pm 0,8$ (6,1-9,6)	$1,5 \pm 0,1$ (1,4-1,6)	$4,3 \pm 0,4$ (3,8-4,6)

Tabelle B-2: Antibiotikagehalte im Deutschen Weidelgras „Lemmos“ des Aufwuchsjahres 2014, welches auf Lössboden kultiviert wurde. Angegeben sind die Antibiotikagehalte in $\mu\text{g kg}^{-1}$ bezogen auf Frischmasse und Trockenmasse der einzelnen Ernteschnitte und Varianten. Als Ergebnis ist der arithmetische Mittelwert dreier Aufarbeitungen \pm die Standardabweichung aufgeführt. Die Spannweite der Messergebnisse ist in Klammern angegeben. Die Bestimmungsgrenze (BG) beträgt für alle Analyten $1 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Variante	Bodentyp	Analyt	Konz. dotiert [mg/kg Gülle]	Antibiotikagehalte im Weidelgras „Lemmos“ – Varianten mit Baunataler Lössboden									
				1. Schnitt		2. Schnitt		3. Schnitt		4. Schnitt		5. Schnitt	
				$\mu\text{g kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW	$\mu\text{g kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW	$\mu\text{g kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW	$\mu\text{g kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW	$\mu\text{g kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW	$\mu\text{g kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW	$\mu\text{g kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW	$\mu\text{g kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW	$\mu\text{g kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW	
19	Baunataler Lössboden	CTC	100	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	
22		DOX	100	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	
25		SMX	100	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	
26		SMZ	20	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	
27		SMZ	50	$2,1 \pm 0,4$ (1,7-2,5)	$1,5 \pm 0,2$ (1,4-1,7)	$12,5 \pm 1,3$ (11,6-14,0)	$2,0 \pm 0,3$ (1,7-2,3)	$12,5 \pm 2,1$ (10,5-14,6)	$2,5 \pm 0,1$ (2,4-2,6)	$16,0 \pm 0,7$ (15,6-16,8)	$6,8 \pm 1,6$ (5,1-8,2)	$9,1 \pm 2,1$ (6,8-11,1)	
28		SMZ	100	$5,7 \pm 6,0$ (5,2-6,4)	$3,7 \pm 0,3$ (3,3-3,9)	$29,2 \pm 2,5$ (26,3-30,8)	$4,1 \pm 0,2$ (3,9-4,2)	$26,1 \pm 1,0$ (25,1-27,0)	$3,4 \pm 0,2$ (3,3-3,7)	$22,0 \pm 1,5$ (20,9-23,7)	$12,0 \pm 0,8$ (11,0-12,5)	$17,2 \pm 1,2$ (15,8-18,0)	
Metaboliten													
26		N-Ac-SMZ		< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	
27		N-Ac-SMZ		< BG/>NG $0,9 \pm 0,1$ (0,8-1,0)	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	
28		N-Ac-SMZ		$3,2 \pm 0,5$ (2,9-3,7)	$1,5 \pm 0,1$ (1,4-1,6)	$11,9 \pm 0,6$ (11,2-12,3)	$1,5 \pm 0,1$ (1,4-1,6)	$9,3 \pm 0,6$ (8,7-9,9)	$1,5 \pm 0,2$ (1,3-1,6)	$9,5 \pm 1,2$ (8,2-10,4)	< BG	< BG	

Tabelle B-3: Antibiotikagehalte in Rindergülle des Aufwuchsjahres 2014 nach durchgeführter Fermentation. Angegeben sind die Antibiotikagehalte in mg kg^{-1} . Als Ergebnis ist der arithmetische Mittelwert dreier Aufarbeitungen \pm die Standardabweichung aufgeführt. Die Spannweite der Messergebnisse ist in Klammern angegeben. $BG = 2 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Reaktor	Analyt	Dotierung [$\text{mg kg}_{\text{Gülle}}^{-1}$]	Analyse [$\text{mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$]	Verlust durch Fermentation [%]
103	(Epi)-CTC	20	4,4 \pm 0,6 (3,8-5,0)	78,0
104	(Epi)-CTC	50	12,3 \pm 1,3 (10,8-13,2)	75,4
105	(Epi)-CTC	100	38,3 \pm 1,3 (36,8-39,2)	61,7
106	(Epi)-DOX	20	16,5 \pm 1,0 (15,4-17,3)	17,3
107	(Epi)-DOX	50	40,4 \pm 0,7 (39,7-41,0)	19,2
108	(Epi)-DOX	100	76,7 \pm 0,4 (76,2-77,0)	23,3
109	SMX	20	< BG	100,0
110	SMX	50	< BG	100,0
111	SMX	100	< BG	100,0
112	SMZ	20	14,6 \pm 0,1 (14,5-14,6)	27,2
113	SMZ	50	37,1 \pm 0,8 (36,4-37,9)	25,8
114	SMZ	100	70,7 \pm 0,4 (69,3-71,5)	29,3

Tabelle B-4: Nachgewiesene Transformationsprodukte in Rindergülle des Aufwuchsjahres 2014 nach durchgeführter Fermentation. Angegeben sind die Gehalte in mg kg^{-1} . Als Ergebnis ist der arithmetische Mittelwert dreier Aufarbeitungen \pm die Standardabweichung aufgeführt. Die Spannweite der Messergebnisse ist in Klammern angegeben. $BG = 2 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Reaktor	Transformationsprodukt	Dotierung [$\text{mg kg}_{\text{Gülle}}^{-1}$]	Analyse [$\text{mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$]	Bildung durch Fermentation [%]
103	(Epi)-CTC \rightarrow (Epi)-iso-CTC	20	16,5 \pm 0,4 (16,2-16,9)	82,5
104	(Epi)-CTC \rightarrow (Epi)-iso-CTC	50	36,7 \pm 1,1 (35,5-37,7)	73,4
105	(Epi)-CTC \rightarrow (Epi)-iso-CTC	100	61,7 \pm 0,1 (61,6-61,8)	61,7

Tabelle B-5: Nachgewiesene Antibiotikagehalte im Boden nach der Ernte der fünf Weidelgras-Schnitte. Angegeben sind die mittleren Konzentrationen ($n = 2$) in $\mu\text{g kg}^{-1}$ bezogen auf Frisch- und Trockenmasse \pm die Standardabweichung. BG = $1 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Variante	Bodentyp	Analyt	Konz. dotiert [mg kg _{Gülle} ⁻¹]	Nachgewiesene Konzentration		
				$\mu\text{g kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW	$\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ \pm STDAW	
3	Volkmarser Sandboden	(Epi)-CTC	20	35,0 \pm 4,7	38,7 \pm 5,2	
4		(Epi)-CTC	50	78,4 \pm 16,2	86,6 \pm 17,7	
5		(Epi)-CTC	100	121,5 \pm 20,1	130,7 \pm 21,6	
6		(Epi)-DOX	20	97,7 \pm 9,0	105,5 \pm 9,6	
7		(Epi)-DOX	50	285,3 \pm 7,7	314,5 \pm 8,7	
8		(Epi)-DOX	100	479,0 \pm 9,5	534,3 \pm 10,0	
9		SMX	20	< NG	< NG	
10		SMX	50	< NG	< NG	
11		SMX	100	< NG	< NG	
12		SMZ	20	32,7 \pm 1,7	36,0 \pm 1,8	
13		SMZ	50	90,0 \pm 0,5	101,7 \pm 0,7	
14		SMZ	100	191,6 \pm 2,0	215,6 \pm 2,1	
17		Baunataler Lößboden	(Epi)-CTC	20	17,3 \pm 2,5	21,2 \pm 3,0
18			(Epi)-CTC	50	35,7 \pm 2,5	42,2 \pm 2,9
19	(Epi)-CTC		100	55,0 \pm 2,3	66,1 \pm 2,9	
20	(Epi)-DOX		20	60,5 \pm 4,3	72,5 \pm 5,2	
21	(Epi)-DOX		50	135,5 \pm 21,9	144,9 \pm 23,7	
22	(Epi)-DOX		100	283,4 \pm 43,0	307,4 \pm 47,1	
23	SMX		20	< NG	< NG	
24	SMX		50	< NG	< NG	
25	SMX		100	< NG	< NG	
26	SMZ		20	13,8 \pm 1,8	15,6 \pm 2,0	
27	SMZ		50	46,0 \pm 12,6	52,3 \pm 14,3	
28	SMZ	100	94,3 \pm 33,7	107,7 \pm 38,6		
Metabolite und / oder Transformationsprodukte						
3	Volkmarser Sandboden	(Epi)-iso-CTC	-	9,4 \pm 0,8	10,4 \pm 0,8	
4		(Epi)-iso-CTC	-	16,2 \pm 0,3	17,9 \pm 0,3	
5		(Epi)-iso-CTC	-	30,2 \pm 5,7	32,5 \pm 6,1	
17	Baunataler Lößboden	(Epi)-iso-CTC	-	5,7 \pm 0,2	7,0 \pm 0,2	
18		(Epi)-iso-CTC	-	9,9 \pm 1,1	11,6 \pm 1,2	
19		(Epi)-iso-CTC	-	15,6 \pm 0,8	18,8 \pm 1,0	

Tabelle B-6: Antibiotikagehalte in Möhren der Sorte „Almaro“ des Aufwuchsjahres 2015, welche mit antibiotikahaltiger gelagerter und fermentierter Gülle gedüngt wurden. Angegeben sind die Antibiotikagehalte in $\mu\text{g kg}^{-1}$ bezogen auf Frischmasse und Trockenmasse der einzelnen Möhrenbestandteile und Varianten. Als Ergebnis ist der arithmetische Mittelwert von sechs Aufarbeitungen \pm die Standardabweichung aufgeführt. Die Spannweite der Messergebnisse ist in Klammern angegeben. Die Bestimmungsgrenze (BG) beträgt in der Möhrenrübe, Möhrenschnitzschale und Möhrenwurzel für alle Analyten $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Die Bestimmungsgrenze (BG) beträgt im Möhrengrün für alle Analyten $2 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Variante	Bodentyp	Vorbehandlung der Gülle	Analyt	Konz. dotiert [mg/kg Gülle]	Antibiotikagehalte in Möhren der Sorte „Almaro“ – Varianten mit gelagerter und fermentierter Rindergülle						
					Möhrengrün		Möhrenrübe		Möhrenschnitzschale		Möhrenwurzel
					$\mu\text{g kg}^{-1}$ STDAW n = 6	$\mu\text{g kg}^{-1}$ STDAW n = 6	$\mu\text{g kg}^{-1}$ STDAW n = 6	$\mu\text{g kg}^{-1}$ STDAW n = 6	$\mu\text{g kg}^{-1}$ STDAW n = 4	$\mu\text{g kg}^{-1}$ STDAW n = 4	
3	Volkmarser Sandboden	Lagerung	CTC	100	< BG	< BG	< BG	$1,0 \pm 0,5$ (0,5-1,9)	$5,8 \pm 3,4$ (2,7-12,1)	$19,0 \pm 0,2$ (18,8-19,2)	$76,9 \pm 0,8$ (76,0-77,8)
4			DOX	100	< BG	$0,5 \pm 0,2$ (< BG-0,8)	$2,6 \pm 0,9$ (2,1-4,3)	$5,8 \pm 2,1$ (2,8-8,5)	$37,0 \pm 14,1$ (18,7-57,4)	$68,7 \pm 0,9$ (67,8-69,5)	$278,0 \pm 3,5$ (274,4-281,6)
5			SMX	100	$4,1 \pm 0,9$ (2,9-5,0)	$3,3 \pm 0,4$ (2,9-3,9)	$19,3 \pm 2,8$ (16,0-22,8)	$2,4 \pm 0,5$ (1,7-3,0)	$15,7 \pm 3,4$ (11,5-20,1)	$44,7 \pm 2,8$ (42,0-47,4)	$181,0 \pm 11,5$ (170,0-191,8)
6			SMZ	100	$5,6 \pm 1,4$ (3,7-6,7)	$1,6 \pm 0,4$ (1,4-2,1)	$9,2 \pm 2,2$ (7,2-12,3)	$4,6 \pm 0,9$ (3,2-5,4)	$30,5 \pm 5,7$ (22,1-35,7)	$81,5 \pm 1,9$ (79,4-83,7)	$330,2 \pm 7,6$ (321,3-339,0)
7			CTC	100	< BG	< BG	< BG	$0,5 \pm 0,2$ (< BG-0,8)	$3,3 \pm 1,7$ (1,3-5,8)	$68,8 \pm 2,4$ (66,7-71,6)	$278,5 \pm 9,7$ (270,0-289,8)
8			DOX	100	< BG	$1,6 \pm 0,5$ (1,0-2,2)	$9,8 \pm 3,0$ (5,7-14,0)	$26,0 \pm 13,2$ (12,8-43,6)	$182,0 \pm 98,0$ (88,7-313,0)	$190,7 \pm 1,5$ (189,5-192,9)	$772,3 \pm 6,0$ (767,3-780,9)
9	SMX	100	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	
10	SMZ	100	$38,9 \pm 8,7$ (29,9-49,5)	$1,7 \pm 0,4$ (1,4-2,2)	$10,9 \pm 2,3$ (9,1-14,0)	$4,6 \pm 0,5$ (3,9-5,0)	$32,3 \pm 2,9$ (28,6-35,9)	$134,3 \pm 4,9$ (129,8-139,1)	$543,9 \pm 19,9$ (525,6-563,2)		

Tabelle B-8: Antibiotikagehalte in Rindergülle des Aufwuchsjahres 2015 während des Fermentationsprozesses. Angegeben sind die Antibiotikagehalte in mg kg^{-1} . Als Ergebnis ist der arithmetische Mittelwert \pm die Standardabweichung aufgeführt. Die Spannweite der Messergebnisse ist in Klammern angegeben. $\text{BG} = 2 \mu\text{g kg}^{-1}$. Der daraus resultierende mittlere Verlust ist in % aufgeführt.

Fermentationsdauer [Tage]	Antibiotikagehalte und darüber ermittelte Verluste in der Rindergülle während des Fermentationsprozesses über 40 Tage											
	(Epi)-Chlortetracyclin / (Epi)-iso-Chlortetracyclin				(Epi)-Doxycyclin			Sulfamethazin			Sulfamethoxazol	
	Gehalt (Epi)-CTC $\text{mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW n=3	Gehalt (Epi)-iso-CTC $\text{mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW n=3	Summe (Epi)-CTC + Isoform $\text{mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$	Mittlerer Verlust %	Gehalt $\text{mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW n=3	Mittlerer Verlust %	Gehalt $\text{mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW n=3	Mittlerer Verlust %	Gehalt $\text{mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW n=3	Mittlerer Verlust %	Gehalt $\text{mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW n=3	Mittlerer Verlust %
0	111,9 \pm 2,3 (110,1-114,5)	-	111,9	-	82,3 \pm 11,9 (70,0-93,6)	17,7	76,6 \pm 3,5 (73,1-80,2)	23,4	91,1 \pm 1,8 (89,3-92,9)	8,9		
1	90,6 \pm 2,6 (88,9-93,5)	13,3 \pm 0,1 (13,2-13,4)	103,9	-	73,2 \pm 6,8 (68,1-81,0)	26,8	67,5 \pm 3,9 (63,0-70,2)	32,5	8,4 \pm 0,6 (7,8-9,0)	91,6		
2	80,8 \pm 8,0 (74,3-89,7)	16,2 \pm 1,6 (14,8-17,9)	97,1	2,9	67,3 \pm 11,7 (55,1-78,3)	32,7	56,7 \pm 6,4 (51,9-63,9)	43,3	< BG	100		
4	59,2 \pm 1,6 (57,8-60,9)	28,5 \pm 1,5 (27,2-30,1)	87,7	12,3	63,4 \pm 1,6 (61,7-64,9)	36,6	57,1 \pm 3,0 (53,8-59,8)	42,9	< BG	100		
6	48,4 \pm 9,3 (40,6-58,7)	34,2 \pm 7,2 (29,4-42,5)	82,6	17,4	60,3 \pm 9,1 (49,9-66,5)	39,7	57,5 \pm 3,0 (54,9-60,8)	42,5	< BG	100		
8	42,9 \pm 6,1 (36,1-47,9)	40,7 \pm 7,2 (32,6-46,2)	83,6	16,4	57,3 \pm 6,0 (50,4-61,3)	42,7	44,2 \pm 5,8 (37,5-47,8)	55,8	< BG	100		
11	38,0 \pm 8,5 (28,4-43,9)	46,9 \pm 10,2 (35,5-55,0)	84,9	15,1	58,1 \pm 6,1 (51,1-62,3)	41,9	49,3 \pm 8,5 (39,5-54,7)	50,7	< BG	100		
13	37,0 \pm 3,1 (33,4-39,0)	53,6 \pm 4,1 (49,0-56,9)	90,6	9,4	56,6 \pm 1,1 (55,6-57,7)	43,4	46,8 \pm 2,5 (43,9-48,5)	53,2	< BG	100		
15	26,1 \pm 3,7 (22,5-30,0)	45,1 \pm 5,5 (40,7-51,3)	71,2	28,8	44,6 \pm 6,0 (39,0-50,9)	55,4	44,7 \pm 5,6 (38,649,7)	55,3	< BG	100		

Tabelle B-9: Fortführung der Tabelle B-8.

Fermentationsdauer [Tage]	Antibiotikagehalte und darüber ermittelte Verluste in der Rindergülle während des Fermentationsprozesses über 40 Tage													
	(Epi)-Chlortetracyclin / (Epi)-iso-Chlortetracyclin				(Epi)-Doxycyclin				Sulfamethazin				Sulfamethoxazol	
	Gehalt (Epi)-CTC mg kg _{FM} ⁻¹ ± STDAW n=3	Gehalt (Epi)-iso-CTC mg kg _{FM} ⁻¹ ± STDAW n=3	Summe (Epi)- CTC + Isoform mg kg _{FM} ⁻¹	Mittlerer Verlust %	Gehalt mg kg _{FM} ⁻¹ ± STDAW n=3	Mittlerer Verlust %	Gehalt mg kg _{FM} ⁻¹ ± STDAW n=3	Mittlerer Verlust %	Gehalt mg kg _{FM} ⁻¹ ± STDAW n=3	Mittlerer Verlust %	Gehalt mg kg _{FM} ⁻¹ ± STDAW n=3	Mittlerer Verlust %		
18	26,7 ± 1,2 (25,7-28,0)	56,4 ± 1,5 (55,2-58,1)	83,2	16,8	64,0 ± 6,6 (56,5-68,3)	36,0	43,5 ± 4,5 (38,5-47,0)	56,5	< BG	100				
20	25,8 ± 1,4 (24,1-26,6)	58,8 ± 3,8 (54,4-61,1)	84,5	15,5	70,3 ± 3,8 (66,9-74,4)	29,7	43,3 ± 0,7 (42,8-44,1)	56,7	< BG	100				
22	23,9 ± 0,9 (22,8-24,4)	58,5 ± 3,5 (54,5-60,6)	82,4	17,6	62,9 ± 7,5 (55,4-70,5)	37,1	43,8 ± 3,6 (39,9-46,8)	56,2	< BG	100				
25	22,3 ± 0,6 (21,8-22,9)	62,5 ± 2,3 (60,1-64,6)	84,7	15,3	69,5 ± 11,2 (61,5-77,4)	30,5	41,6 ± 2,9 (38,3-44,0)	58,4	< BG	100				
27	22,0 ± 1,4 (20,7-23,4)	62,8 ± 9,5 (52,4-71,1)	84,8	15,2	75,3 ± 4,8 (69,8-78,9)	24,7	43,4 ± 0,8 (42,5-44,2)	56,6	< BG	100				
29	21,6 ± 1,1 (20,5-22,7)	53,6 ± 2,6 (51,4-56,5)	75,2	24,8	71,5 ± 3,5 (67,5-74,0)	28,5	41,6 ± 2,7 (39,8-44,7)	58,4	< BG	100				
32	19,8 ± 5,2 (14,7-25,0)	53,9 ± 11,9 (42,7-66,4)	73,6	26,4	62,2 ± 4,3 (59,2-67,1)	37,8	42,0 ± 1,4 (40,6-43,5)	58	< BG	100				
35	20,7 ± 2,0 (18,5-22,4)	58,8 ± 3,8 (54,4-61,2)	79,5	20,5	65,2 ± 4,3 (60,2-68,0)	34,8	39,6 ± 3,4 (35,7-41,8)	60,4	< BG	100				
40	14,9 ± 3,1 (11,4-17,1)	51,4 ± 7,1 (44,1-58,2)	66,2	33,8	58,4 ± 6,5 (53,8-65,9)	41,6	39,4 ± 2,3 (36,9-41,4)	60,6	< BG	100				

Tabelle B-10: Antibiotikagehalte in Rindergülle des Aufwuchsjahres 2015 während der 8-tägigen Lagerung. Angegeben sind die Antibiotikagehalte in mg kg^{-1} . Als Ergebnis ist der arithmetische Mittelwert dreier Aufarbeitungen \pm die Standardabweichung aufgeführt. Die Spannweite der Messergebnisse ist in Klammern angegeben. BG = $2 \mu\text{g kg}^{-1}$. Der daraus resultierende mittlere Verlust ist in % aufgeführt.

Lagerdauer [Tage]	Antibiotikagehalte und darüber ermittelte Verluste in der Rindergülle während des Lagerprozesses über 8 Tage											
	(Epi)-Chlortetracyclin / (Epi)-iso-Chlortetracyclin				(Epi)-Doxycyclin			Sulfamethazin			Sulfamethoxazol	
	Gehalt (Epi)-CTC $\text{mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW n=3	Gehalt (Epi)-iso-CTC $\text{mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW n=3	Summe (Epi)-CTC + Isoform $\text{mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$	Mittlerer Verlust %	Gehalt $\text{mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW n=3	Mittlerer Verlust %	Gehalt $\text{mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW n=3	Mittlerer Verlust %	Gehalt $\text{mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW n=3	Mittlerer Verlust %	Gehalt $\text{mg kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW n=3	Mittlerer Verlust %
0	119,9 \pm 4,2 (115,1-122,6)		119,9	-	101,6 \pm 4,6 (97,0-106,1)	-	94,7 \pm 5,4 (88,8-99,2)	5,3	94,6 \pm 1,5 (92,9-95,9)	5,4		
1	110,0 \pm 0,8 (109,4-110,8)		110,0	-	93,9 \pm 3,2 (90,9-97,4)	6,1	84,7 \pm 6,1 (80,5-91,7)	15,3	76,1 \pm 1,7 (74,2-77,1)	23,9		
2	103,3 \pm 9,9 (95,5-114,5)		103,3	-	92,2 \pm 0,9 (91,4-93,3)	7,8	87,0 \pm 10,1 (78,1-98,0)	13,0	61,4 \pm 1,2 (60,2-62,6)	38,6		
3	106,4 \pm 7,2 (102,0-114,7)	0,9 \pm 1,1 (< BG-2,2)	106,4	-	90,6 \pm 6,6 (83,2-95,9)	9,4	81,6 \pm 4,4 (77,9-86,4)	18,4	44,9 \pm 1,9 (42,8-46,2)	55,1		
4	104,1 \pm 4,2 (101,3-109,0)	1,8 \pm 0,8 (1,2-2,6)	105,9	-	89,3 \pm 3,6 (85,8-92,9)	10,7	87,6 \pm 2,5 (85,3-90,2)	12,4	32,1 \pm 0,4 (31,7-32,5)	67,9		
8	93,3 \pm 8,1 (88,0-102,7)	2,6 \pm 1,8 (1,5-4,7)	95,9	4,1	84,5 \pm 4,5 (80,2-89,1)	15,5	84,0 \pm 1,8 (82,2-85,8)	16,0	7,7 \pm 0,2 (7,6-7,9)	92,3		

Tabelle B-11: Nachgewiesene Antibiotikagehalte im Boden nach der Ernte der Möhren. Angegeben sind die gemittelten Konzentrationen ($n = 6$) in $\mu\text{g kg}^{-1}$ bezogen auf Frisch- und Trockenmasse \pm die Standardabweichung und die Spannweite der Analyseergebnisse.

Variante	Gülevorbehandlung	Analyt	Konz. dotiert [mg/kg Gülle]	Nachgewiesene Konzentration*	
				$\mu\text{g kg}_{\text{FM}}^{-1}$ \pm STDAW	$\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$ \pm STDAW
3 (a, c, d)	aerobe Lagerung	(Epi)-CTC	100	62,5 \pm 14,8 (43,0-79,0)	77,1 \pm 15,7 (46,5-84,6)
4 (a, c, d)		(Epi)-DOX	100	147,9 \pm 22,5 (113,7-173,9)	160,7 \pm 23,8 (124,6-187,51)
5 (a, c, d)		SMX	100	4,1 \pm 0,5 (3,5-4,7)	4,5 \pm 0,6 (3,8-5,1)
6 (a, c, d)		SMZ	100	72,4 \pm 33,7 (43,4-126,9)	78,4 \pm 36,2 (47,5-137,0)
7 (a, c, d)	anaerobe Fermentation	(Epi)-CTC	100	81,8 \pm 51,9 (36,6-150,4)	96,4 \pm 69,1 (39,6-201,2)
8 (a, c, d)		(Epi)-DOX	100	353,7 \pm 26,4 (313,2-381,2)	387,7 \pm 30,0 (340,6-416,8)
9 (a, c, d)		SMX	100	< BG	< BG
10 (a, c, d)		SMZ	100	103,6 \pm 3,7 (97,3-107,6)	112,0 \pm 4,0 (105,1-116,1)
Metabolite und / oder Transformationsprodukte					
3 (a, c, d)	aerobe Lagerung	(Epi)-iso-CTC	-	7,4 \pm 1,5 (5,3-9,1)	9,0 \pm 1,6 (5,8-9,8)
7 (a, c, d)	anaerobe Fermentation	(Epi)-iso-CTC	-	14,7 \pm 5,9 (8,4-21,8)	17,1 \pm 8,3 (9,0-29,9)

*BG = 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$

Tabelle B-12: Nachgewiesene Antibiotikagehalte in den einzelnen Bodenschichten der Lysimeter ($n = 3$). Ansätze mit Sulfamethoxazol waren negativ und sind daher nicht aufgeführt.

Bodentiefe [cm]	Boden	Säule	Konzentration [$\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$]	Boden	Säule	Konzentration [$\mu\text{g kg}_{\text{TM}}^{-1}$]
0 - 5	Baunataler Löß	7 ((Epi)-CTC) / ((Epi)-iso-CTC)	8,7 \pm 2,5 / 3,6 \pm 1,0	Volkmarser Sand	33 ((Epi)-CTC) / ((Epi)-iso-CTC)	12,2 \pm 0,3 / 2,7 \pm 0,1
5 - 10			< BG / < BG			< BG / < BG
10 - 15			< BG / < BG			< BG / < BG
15 - 20			< BG / < BG			< BG / < BG
20 - 25			< BG / < BG			< BG / < BG
25 - 30			< BG / < BG			< BG / < BG
30 - 35			< BG / < BG			< BG / < BG
35 - 40			< BG / < BG			< BG / < BG
40 - 45			< BG / < BG			< BG / < BG
45 - 50			< BG / < BG			< BG / < BG
0 - 5	Baunataler Löß	13 ((Epi)-DOX)	15,8 \pm 2,2	Volkmarser Sand	39 ((Epi)-DOX)	21,6 \pm 1,7
5 - 10			< BG			< BG
10 - 15			< BG			< BG
15 - 20			< BG			< BG
20 - 25			< BG			< BG
25 - 30			< BG			< BG
30 - 35			< BG			< BG
35 - 40			< BG			< BG
40 - 45			< BG			< BG
45 - 50			< BG			< BG
0 - 5	Baunataler Löß	25 (SMZ)	4,8 \pm 0,4	Volkmarser Sand	51 (SMZ)	5,9 \pm 0,1
5 - 10			< BG (0,5 \pm 0,1)			2,1 \pm 0,1
10 - 15			< BG (0,1)			1,1 \pm 0,1
15 - 20			< BG (0,1)			< BG (0,4 \pm 0,1)
20 - 25			< BG (0,1)			< BG (0,1)
25 - 30			< BG (0,1)			< BG (0,1)
30 - 35			< BG (0,1)			< BG (0,1)
35 - 40			< BG (0,1)			< BG (0,1)
40 - 45			< BG (0,1)			< BG (0,2 \pm 0,1)
45 - 50			< BG (0,1)			< BG (0,3 \pm 0,1)

8.3 Anhang C zu Kapitel 5 „Diskussion

Table C-1: Im Rahmen der Methodenentwicklung bestimmte absolute Wiederfindungen in Bezug auf Lösungsmittelstandards (Eluentengemisch). Dotierniveau: 50 µg kg⁻¹.

Absolute Wiederfindungen als Peakflächen- und Responsevergleich [%]						
Substanz	Gülle		Möhrenrübe		Weidelgras	
	Fläche	Response	Fläche	Response	Fläche	Response
(Epi)-CTC	85,2	114,3	104,2	95,2	118,6	115,0
(Epi)-DOC	108,2	145,3	105,6	96,7	80,4	78,0
SMZ	54,4	96,8	75,3	104,0	60,7	94,0
SMX	52,3	97,4	69,1	100,6	48,3	94,8
N-Ac-SMZ	52,7	93,7	74,2	102,5	59,5	92,4
N-Ac-SMX	47,6	88,7	69,7	101,4	50,7	99,6
(Epi)-iso-CTC	75,4	101,2	110,5	101,0	92,9	90,1
SMZ- ¹³ C ₆	56,3		72,4		64,5	
SMX- ¹³ C ₆	53,7		68,8		50,9	
DEM	74,5		109,4		103,2	
WDF-Bereich	48 – 108	89 – 145	74 – 111	95 – 104	48 – 119	78 – 115

Tabelle C-2: Methoden zum Nachweis von Tetracyclinen und Sulfonamiden in Umwelt-, Futtermittel- und Lebensmittelproben.

Extraktionsmittel	Matrix	Clean-up	Analysemethode / Quantifizierung	BG / *NG	WDF	Literatur
Ultraschallextraktion						
Methanol / Aceton	Boden	-	LC-MS/MS / Matrixkalibrierung	SMZ: 0,6 µg kg ⁻¹	SMZ: 91,54 %	(Carter et al., 2014)
	Gülle	SPE (HLB)	LC-ESI-MS/MS / Matrixkalibrierung	*CTC: 4,2 µg kg ⁻¹ *DOX: 8,5 µg kg ⁻¹ *SMX: 3,0 µg kg ⁻¹ *SMZ: 2,8 µg kg ⁻¹	CTC: 92,3 % DOX: 103,4 % SMX: 90,2 % SMZ: 81,7 %	(Huang et al., 2013)
EDTA-Natrium-Phosphat-Puffer pH 4 mit Acetonitril	Boden			*CTC: 10,5 µg kg ⁻¹ *DOX: 14,8 µg kg ⁻¹ *SMX: 2,4 µg kg ⁻¹ *SMZ: 3,8 µg kg ⁻¹	CTC: 132,7 % DOX: 105,6 % SMX: 110,9 % SMZ: 80,4 %	
	Gülle	n-Hexan	LC-MS/MS / Matrixkalibrierung	CTC: 100 µg kg ⁻¹ SMX: 9100 µg kg ⁻¹ SMZ: 100 µg kg ⁻¹	CTC: 94 % SMX: 95 % SMZ: 101 %	(Martínez-Carballo et al., 2007)
	Gülle	SPE (HLB)	LC-MS/MS / Matrixkalibrierung	Epi-CTC: 1,9 µg L ⁻¹ CTC: 3,4 µg L ⁻¹ iso-CTC: 7,3 µg L ⁻¹	Epi-CTC: 102 % CTC: 106 % iso-CTC: 112 %	(Shelver and Varel, 2012)
	Gülle	SPE (HLB), Elutionsmittel: Methanol/Dichlormethan/Aceton (40/36/24)	LC-MS/MS / Kalibrierfunktion mit Wasser	CTC: 45 µg kg ⁻¹ SMX: 10 µg kg ⁻¹	CTC: 94 – 104 % SMX: 73 – 94 %	(Pan et al., 2011)
Flüssig-Flüssig-Extraktion / Fest-Flüssig-Extraktion						
Citrapuffer pH 4,7 mit 0,05 M EDTA / Methanol, Ethanol, Dichlormethan (1:3:1)	Gülle	keine SPE	LC-MS/MS / Matrixkalibrierung (SA s: korrespondierende ¹³ C ₆ -markierte ISTDs; TC's: ¹³ C ₆ -SMX)	CTC: 350 µg kg ⁻¹ DOX: 500 µg kg ⁻¹ SMX: 80 µg kg ⁻¹ SMZ: 80 µg kg ⁻¹	CTC: 73 – 75 % DOX: 86 – 87 % SMX: 99 – 103 % SMZ: 100 – 108 %	(Spielmeier et al., 2014)
	Druckflüssigkeitsextraktion					
Methanol / 80 °C / 1.500 psi / 10 Min.	Getreide	SPE (HLB)	LC-MS/MS / Lösungsmittelkalibrierung (AcN/H ₂ O) mit Chlorpropamid als ISTD	SMX: 0,365 µg kg ⁻¹	SMX: 71 %	(Franklin et al., 2016)
Methanol / Citronensäure (0,2 M, 50:50, pH 4,5) + EDTA / 50 °C / 1.500 psi / 2 x 5 Min.	Gras	SPE (Strata-X)	LC-MS/MS / keine genauen Angaben	SMX: 4,4 µg kg ⁻¹	SMX: 60 %	(Chitescu et al., 2013; Chitescu et al., 2012)

Tabelle C-3: Methoden zum Nachweis von Tetracyclinen und Sulfonamiden in Wasserproben.

Vorbehandlung	Substanzen	Matrix	Analysemethode / Quantifizierung	BG	WDF	Literatur
Ansäuerung / EDTA-Zusatz / SPE (HLB) / Anreicherungs-volumen: 500 mL	u.a. CTC, SMX, SMZ	Grund-, Oberflächenwasser	LC-MS/MS / Kalibrierung mit NANOpure Wasser	CTC: 200 ng L ⁻¹ SMX: 270 ng L ⁻¹ SMZ: 180 ng L ⁻¹	CTC: 117 – 119 % SMX: 97 – 107 % SMZ: 95 – 102 %	(Batt and Aga, 2005)
Ansäuerung auf pH 4 / SPE (HLB) / Anreicherungs-volumen 50 mL	u.a. SMX, SMZ	Abwasser	LC-MS/MS / Kalibrierung mit NANOpure Wasser	SMX: 15 ng L ⁻¹ SMZ: 20 ng L ⁻¹	SMX: 99 – 110 % SMZ: 72 – 82 %	(Botitsi et al., 2007)
Ansäuerung auf pH 3 / Zugabe von 0,2 g Na ₂ EDTA / SPE (HLB) / Anreicherungs-volumen: 500 mL	u.a. CTC, iso-CTC, DOX, SMX, N-Ac-SMX, SMZ, N-Ac-SMZ	Abwasser	LC-MS/MS / keine Angaben	CTC: 8 ng L ⁻¹ iso-CTC: 3,35 ng L ⁻¹ DOX: 10 ng L ⁻¹ SMX: 0,14 ng L ⁻¹ N-Ac SMX: 0,7 ng L ⁻¹ SMZ: 0,91 ng L ⁻¹ N-Ac-SMZ: 1,18 ng L ⁻¹	CTC: 64 % iso-CTC: 124 % DOX: 120 % SMX: 50,7 % N-Ac SMX: 73,7 % SMZ: 70,1 % N-Ac-SMZ: 92,3 %	(Zhang et al., 2015)

Tabelle C-4: Auswahl einiger Studien zur Bestimmung der Halbwertszeiten (DT_{50}) und Eliminierungsraten von Antibiotika in Gülle.

Analyt	Art der Güllevorbehandlung	DT_{50} / Eliminierung [%]	Literaturstelle
Chlortetracyclin	Rindergülle, 35 Tage anaerobe Fermentation, 40 °C	DT_{50} : n. b. / 61,7–78 %	diese Arbeit
	Rindergülle, 40 Tage anaerobe Fermentation, 40 °C	DT_{50} : 6 Tage / 85,1 %	
	Rindergülle, 8 Tage aerobe Lagerung, 20 °C, im Dunkeln	DT_{50} : 11 Tage / 6,7 %	
Chlortetracyclin	Kälbergülle, 33 Tage anaerobe Gärung, 35 °C	DT_{50} : 18 Tage / 75 %	(Arikan, 2008)
(Epi)-Chlortetracyclin	Rindergülle, 11–24 °C	DT_{50} : 8 Tage	(Arikan et al., 2009a)
Chlortetracyclin	Kälbergülle, 30 Tage Kompostierung, 25 °C	DT_{50} : n. b. / 49 %	(Arikan et al., 2009b)
	Kälbergülle sterilisiert, 30 Tage Kompostierung, 25 °C	DT_{50} : n. b. / 40 %	
	Kälbergülle, 30 Tage Kompostierung, 55 °C	DT_{50} : n. b. / 99 %	
	Kälbergülle sterilisiert, 30 Tage Kompostierung, 55 °C	DT_{50} : n. b. / 98 %	
Chlortetracyclin	Schweinegülle, 42 Tage aerobe Kompostierung	DT_{50} : 87 Tage# / 27 %	(Bao et al., 2009)
Chlortetracyclin	Rindergülle, 126 Tage / 105 Tage Kompostierung, aerob, pH 6,9–8,1	DT_{50} : 13,5–26,5 Tage#	(Cessna et al., 2011)
Doxycyclin	Rindergülle, 35 Tage anaerobe Fermentation, 40 °C	DT_{50} : n. b. / 17,3–23,3 %	diese Arbeit
	Rindergülle, 40 Tage anaerobe Fermentation, 40 °C	DT_{50} : n. b. * (24–52 Tage) / 41,6 %	
	Rindergülle, 8 Tage aerobe Lagerung, 20 °C, im Dunkeln	DT_{50} : n. b. * (11 Tage) / 15,5 %	
Doxycyclin	Schweinegülle, anaerob, 112 Tage, 20 °C	DT_{50} : 52,5 Tage / 46 % (4 Wochen)	(Szatmári et al., 2011)
Tetracyclin	Schweinegülle, belüftet, keine Temperaturangaben, 8 Tage, pH 6,2–6,4	DT_{50} : 4,5 Tage / 70 %	(Kühne et al., 2000)
	Schweinegülle, nicht belüftet, keine Temperaturangaben, pH 7,6–8,7	DT_{50} : 9 Tage / 43 %	
Tetracyclin	Schweinegülle, Belüftung beim Rühren, 8 °C, 48 Tage	DT_{50} : 55–57 Tage / 50–54 %	(Winckler and Grafe, 2001)
	Schweinegülle, Belüftung beim Rühren, außen gelagert	DT_{50} : 105 Tage / 70 %	
Sulfamethazin	Rindergülle, 35 Tage anaerobe Fermentation, 40 °C	DT_{50} : n. b. / 25,8–29,3 %	diese Arbeit
	Rindergülle, 40 Tage anaerobe Fermentation, 40 °C	DT_{50} : 7 Tage / 60,6 %	
	Rindergülle, 8 Tage aerobe Lagerung, 20 °C, im Dunkeln	DT_{50} : 7,5 Tage / 16,0 %	
Sulfamethazin	Wirtschaftsdünger, anaerobe Bedingungen	DT_{50} : ca. 7 Tage	(Böhm, 1996)
Sulfamethazin	Rindergülle, 126 Tage / 105 Tage Kompostierung	DT_{50} : 26,8–237 Tage#	(Cessna et al., 2011)
Sulfamethoxazol	Rindergülle, 35 Tage anaerobe Fermentation, 40 °C	DT_{50} : n. b. / 100 %	diese Arbeit
	Rindergülle, 40 Tage anaerobe Fermentation, 40 °C	DT_{50} : 0,5 Tage / 100 %	
	Rindergülle, 8 Tage aerobe Lagerung, 20 °C, im Dunkeln	DT_{50} : 3 Tage / 92,3 %	
Sulfamethoxazol	Schweine- und Rindergülle, Maissilage, 35–42 Tage, 40 °C	DT_{50} : 0,5–0,8 Tage	(Spielmeyer et al., 2017b)

n. b.: nicht bestimmt, da lediglich am letzten Tag der Fermentation Proben zur Analyse entnommen wurden.; * Ermittlung erwies sich aufgrund der starken Streuung der Messergebnisse als schwierig; #Kinetik erster Ordnung.

Tabelle C-5: Zusammenstellung maximaler Antibiotikagehalte in verschiedenen Bodentiefen aus Literaturdaten.

Wirkstoffe	Bodenschicht [cm]	Konzentration [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Literatur
Tetracycline			
Chlortetracyclin	0 – 5	8,2 (Löß), 12,2 (Sand)	diese Arbeit (Lysimeterböden)
	0 – 30	max. 7	(Alexy et al., 2004; LANUV, 2007)
	0 – 30	4,5 – 12,5	(Höper et al., 2003; Kues et al., 2004; LANUV, 2007)
	0 – 10	0 – 25,4	(Hamscher et al., 2000; LANUV, 2007)
	10 – 20	0 – 14,6	(Hamscher et al., 2000; LANUV, 2007)
	20 – 40	0 – 26,4	(Hamscher et al., 2000; LANUV, 2007)
	30 – 40	2,3 – 4,2	(Höper et al., 2003; LANUV, 2007)
	0 – 10	7	(Hamscher et al., 2002)
	0 – 30	93	(Nieder et al., 2018; Pawelzick et al., 2004)
Doxycyclin	0 – 5	15,8 (Löß), 21,6 (Sand)	diese Arbeit (Lysimeterböden)
Oxytetracyclin	40 – 90	< 1	(Höper et al., 2003)
Tetracyclin	0 – 30	35 – 295*	(Hamscher et al., 2005a)
		450 – 900	(Nieder et al., 2018; Winckler and Grafe, 2000)
	0 – 30	443	(Nieder et al., 2018; Pawelzick et al., 2004)
		200	(Hamscher et al., 2002)
Sulfonamide			
Sulfamethazin	0 – 5	4,8 (Löß), 5,9 (Sand)	diese Arbeit (Lysimeterböden)
	0 – 30	4,5	(Nieder et al., 2018; Pawelzick et al., 2004)
	0 – 30	0,7 – 2,1	(Höper et al., 2003; Kues et al., 2004; LANUV, 2007)
	30 – 40	< 1 bis 1,2	(Höper et al., 2003; LANUV, 2007)
	40 – 90	< 1	(Höper et al., 2003; LANUV, 2007)
	0 – 10	0 – 2*	(Hamscher et al., 2005a)
		11	(Hamscher et al., 2002)
		15	(Christian et al., 2003)
Sulfamethoxazol	0 – 5	-	diese Arbeit (Lysimeterböden)

*je nach Gülleanwendung, Einheit: $\mu\text{g kg}^{-1}$

Tabelle C-6: Mittelwerte bzw. Spannweiten von Tetracyclin- und Sulfonamid-Konzentrationen in pflanzlichen Matrices aus verschiedenen Studien.

Pflanze	Kompartiment	Aufwuchsort	Dotierung	Bezug	Konzentration an Antibiotika [$\mu\text{g kg}^{-1}$]				Bemerkungen	Literatur	
					CTC	DOX	SMX	SMZ			weitere Analyten
Deutsches Weidelgras (<i>Lolium perenne</i>) Sorte Lemmos	Halme	Mitscherlichgefäße (natürliche Licht- und Temperaturverhältnisse)	Gülle (1,3; 3,3; 6,7 mg kg ⁻¹ _{Boden})	TM	< BG	< BG	4,7 – 217,9 (Sand); < BG – 86,1 (Sand); 48,1 (Löß)	N-Acetyl-SMZ: < BG – 86,1 (Sand); < BG – 26,8 (Löß)	5. Schnitte; 2 Böden (Sand, Löß); Aufwuchsperiode: 4 Monate	diese Arbeit	
	Wurzeln	Mitscherlichgefäße (natürliche Licht- und Temperaturverhältnisse)	Gülle (7,1 mg kg ⁻¹ _{Boden})	TM	77 – 278,5	278 – 772,3	< BG – 181	330,2 – 544	19,1 – 150,0 (Epi)- iso-CTC; 5,3 – 7,2 N-Acetyl-SMZ	2 Güllevorbehandlungen (anaerobe Fermentation und aerobe Lagerung); Sandboden; Aufwuchsperiode: 4 Monate	diese Arbeit
Möhren (<i>Daucus carota</i>) Sorte Almaro	Schale	Mitscherlichgefäße (natürliche Licht- und Temperaturverhältnisse)	Gülle (7,1 mg kg ⁻¹ _{Boden})	TM	3,3 – 5,8	37 – 182	BG – 15,7	30,5 – 32,3	n. a.	diese Arbeit	
	Rübe			< BG	2,6 – 9,8	< BG – 19,3	9,2 – 10,9	n. a.			
	Grün			< BG	< BG	< BG – 4,1	23,9 – 38,9	9,1 – 11,9 N-Acetyl-SMZ			
				n. a.	n. a.	138,3	n. a.				
Chinakohl (<i>Brassica rapa</i> var. <i>Pekinensis</i>)	Wurzeln	Hydrokultur	Nährflüssigkeit (232,5 $\mu\text{g L}^{-1}$)	TM	n. a.	n. a.	3200,5	n. a.	n. a.	(Herklötz et al., 2010)	
	Blätter und Halme			n. a.	n. a.	20,1	n. a.				
	Blätter, Halme, Wurzeln			n. a.	n. a.	23,6	n. a.				
				n. a.	n. a.	118,4	n. a.				
Rübsen (<i>Brassica rapa</i>)		Hydrokultur	Nährflüssigkeit (232,5 $\mu\text{g L}^{-1}$)	TM	n. a.	n. a.	441	n. a.			
Mais (<i>Zea mays</i>), Salat (<i>Lactuca sativa</i>), Kartoffeln (<i>Solanum tuberosum</i>)		Gefäße	Gülle (1,25 und 2,5 mg kg ⁻¹ _{Boden})	FM	n. a.	n. a.	n. a.	8 bis 100	n. a.	Aufwuchsperiode: 45 Tage; Konz. in Salat > Kartoffeln > Mais; sandiger Lehm (10 % Ton, 4,7 % C _{org})	(Dolliver et al., 2007)
				TM	n. a.	n. a.	n. a.	100 bis 1200	n. a.		
Radischeschen (<i>Raphanus sativus</i>), Weidelgras (<i>Lolium perenne</i>)		Gefäße (künstliche Bedingungen)	Sandboden (10 mg kg ⁻¹)		n. a.	n. a.	n. a.	< 0,01 (BG)		(Carter et al., 2014)	

Tabelle C-7: Fortführung der Tabelle C-6.

Pflanze	Kompartiment	Aufwuchsort	Dotterung	Bezug	Konzentration an Antibiotika [$\mu\text{g kg}^{-1}$]					Bemerkungen	Literatur
					CTC	DOX	SMX	SMZ	weitere Analyten		
Winterweizen (<i>Triticum aestivum</i>)	Korn	Freiland (Regionen mit hohem Viehbesatz)	Böden welche langjährig mit Gülle gedüngt wurden	FM	< BG bis 111,7 ^a	< BG bis 31,3	n. a.	n. a.	n. a.	(Freitag et al., 2008)	
Frühlingszwiebeln (<i>Allium cepa</i>), Kohl (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i>), Mais (<i>Zea mays</i>)		Gefäße	Böden (1 $\mu\text{g Gefäß}^{-1}$); Medikamentierung von Fermenten (587 $\mu\text{g Gefäß}^{-1}$); Gülle (1.000 und 1587 $\mu\text{g Gefäß}^{-1}$)	FM	2 bis 17	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	(Kumar et al., 2005b)	
Gras (Mischung aus <i>Lolium perenne</i> , <i>Poa pratensis</i> und <i>Poa trivialis</i>)	Halme	Gefäße	Böden (5 mg $\text{kg}_{\text{TM}}^{-1}$)	FM	n. a.	n. a.	6,8 – 21,5	n. a.	< 4,4 OTC	2 Böden (Sand, pH 4,5 und 5,5); Aufwuchsperiode für Gras: 8 Wochen, für Kresse: 6 Wochen	
			Böden (10 mg $\text{kg}_{\text{TM}}^{-1}$)	FM	n. a.	n. a.	5,0 – 17,5	n. a.	< 4,4 OTC		
Brunnenkresse (<i>Nasturtium officinale</i>)		Gefäße	Böden (5 mg $\text{kg}_{\text{TM}}^{-1}$)	FM	n. a.	n. a.	4,1 – 7,6	n. a.	< 4,4 OTC	(Chitescu et al., 2013)	
			Böden (10 mg $\text{kg}_{\text{TM}}^{-1}$)	FM	n. a.	n. a.	4,2 – 7,5	n. a.	< 4,4 OTC		
Karotten (<i>Daucus carota</i>)	ganze Rübe	Gefäße (künstliche Bedingungen)	Böden (3,6 % Ton, 0,7 % C_{org}) (1 mg $\text{kg}_{\text{TM}}^{-1}$)	FM	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	< 23 OTC; < 6,1 SDZ	Aufwuchsperiode: 152 Tage	
				FM	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	< 23 OTC; < 6,1 SDZ		
				FM	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	< 7,2 OTC; < 17 SDZ		
Salat (<i>Lactuca sativa</i>)	Blätter		Abwasser von Kläranlagen (SMX: 580–22.000 ng L^{-1})	unklar	n. a.	n. a.	Korn: 0,64; Stroh: < NG	n. a.	(Boxall et al., 2006)		
Weizen (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Korn und Stroh	Freiland (toniger Lehm)			n. a.	n. a.				(Franklin et al., 2016)	

Tabelle C-8: Fortführung der Tabelle C-6.

Pflanze	Kompartiment	Aufwuchs-ort	Dotierung	Be-zug	Konzentration an Antibiotika [$\mu\text{g kg}^{-1}$]				Bemerkungen	Literatur
					CTC	DOX	SMX	SMZ		
Feldsalat	Grünteil mit Wurzelmasse vermengt	Freiland	Medikamentierung von Ferkeln	TM	n. a.	n. a.	n. a.	< NG SDZ	Gehalte abhängig vom Zeitpunkt der Probenahme; 2 Düngungen	(Grote et al., 2006)
	Halme, Blätter			n. a.	n. a.	n. a.	< NG SDZ			
Winterweizen (<i>Triticum aestivum</i>)	Wurzeln	Freiland	Medikamentierung von Ferkeln	TM	n. a.	n. a.	n. a.	< NG – 500 SDZ	Gehalte abhängig vom Zeitpunkt der Probenahme; 2 Düngungen	
	Stroh			n. a.	n. a.	n. a.	< NG SDZ			
	Korn			n. a.	n. a.	n. a.	< NG SDZ			
	Blätter, Halme			n. a.	n. a.	n. a.	44 SDZ			
Winterweizen (<i>Triticum aestivum</i>)	Korn	Freiland	Medikamentierung von Ferkeln	FM	n. a.	n. a.	n. a.	< NG SDZ	Gehalte abhängig vom Zeitpunkt der Probenahme; 2 Düngungen	(Grote et al., 2007)
	Stroh			n. a.	n. a.	n. a.	< NG SDZ			
	Wurzeln			n. a.	n. a.	n. a.	< NG – 487 SDZ			
	Blätter			n. a.	n. a.	n. a.	50 – 150 SDZ			
	Wurzeln			n. a.	n. a.	n. a.	2.270 – 6.580 SDZ			
	Blätter			n. a.	n. a.	n. a.	86,3 – 98,6 (W); 66,2 – 125,8 (P)			
Porree (<i>Allium porrum</i> L.); Weißkohl (<i>Brassica oleracea</i> L.)	Blätter	Hydrokultur	Nährlösung (5, 10 und 20 $\mu\text{g L}^{-1}$)	FM	n. a.	n. a.	n. a.	50 – 150 SDZ	Anzucht: 50 Tagen Porree, 21 Tage Weißkohl; Dotierung nach Anzucht; Exposition: 10 Tage Porree, 8 Tage Weißkohl	(Grote et al., 2009)
	Wurzeln			n. a.	n. a.	n. a.	2.270 – 6.580 SDZ			
Möhren (<i>Daucus carota</i>), Salat (<i>Lactuca sativa</i>)	Blätter	Hydrokultur	Nährlösung (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$)	FM	n. a.	n. a.	n. a.		2 Böden (lehmi-ger Sand und schluffig toniger Lehm)	(Azanu et al., 2016)
	Wurzeln			n. a.	n. a.	n. a.	Salat: 4,4 – 28,3 Tetracyclin; Möhren: 12 – 36,8 Tetracyclin			

Tabelle C-9: Fortführung der Tabelle C-6.

Pflanze	Kompartiment	Aufwuchsort	Dotierung	Bezug	Konzentration an Antibiotika [$\mu\text{g kg}^{-1}$]				Bemerkungen	Literatur		
					CTC	DOX	SMX	SMZ			weitere Analyten	
Sommergerste (<i>Hordeum vulgare</i>)	Korn	Freiland	Medikamentierung von Ferkeln (geschätzter Antibiotikagehalt in Gülle: 300 – 500 mg kg _{TM} ⁻¹)	unklar	< 0,3 (NG)	n. a.	n. a.	n. a.	< 1,4 (NG) SDZ	2 Böden; Gehalte im Boden zum Zeitpunkt der Ernte: < 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	(Jacobsen et al., 2004)	
	Luzerne (<i>Medicago sativa</i>)	Wurzeln	Hydrokultur	Nährlösung (10 mg L ⁻¹ SMZ)	FM	n. a.	n. a.	4,36 – 13,11	n. a.	n. a.	Kontakt Pflanze-Nährlösungen: 72 Stunden	(Kurwadkar et al., 2017)
Mittleres Drittel		FM			n. a.	n. a.	0,85 – 1,56	n. a.	n. a.			
Oberer Teil		FM			n. a.	n. a.	1,37 – 2,68	n. a.	n. a.			
Gemeine Hasel (<i>Corylus avellana</i> L.)	Wurzeln	Gefäße (künstliche Bedingungen)	Boden (1, 10 und 100 mg kg ⁻¹)	TM	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	510 – 254.440 SDZ	Exposition: 64 Tage	(Michelini et al., 2015)	
	Blätter			TM	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	2.080 SDZ			
Gerste (<i>Hordeum distichum</i>)	Wurzeln und Blätter	in vitro	Nährmedium (300 mg L ⁻¹ SDM)	unklar	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	SDM: Wurzeln: 1.234.000 Blätter: 1.063.000	Analyse erfolgte bereits nach 23 Tagen	(Migliore et al., 1996)	
			Boden (ca. 109 mg kg ⁻¹ SDM)									Wurzeln: 79.020; 47.600; 63.870; Blätter: 18.220; 11.490; 19.350
Gurke (<i>Cucumis sativus</i>), Cherry Tomaten (<i>Solanum lycopersicum</i>), Salat (<i>Lactuca sativa</i>)	Blätter, Früchte, Wurzeln	Gewächshaus	Lehmiger Sandboden; Dotierung über Gießwasser (Endkonz. im Boden: 5, 10 und 20 mg kg ⁻¹)	FM	Gurke: 310 – 1.320; Tomate: 231 – 864; Salat: 346 – 1.364	n. a.	Gurke: 5.633 – 11.330; Tomate: 17.193 – 38.467; Salat: 8.582 – 30.589	Gurke: 5.359 – 16.319; Tomate: 9.573 – 42.445; Salat: 7.813 – 25.993		Aufwuchspriode: 45 Tage; Konz. in Wurzeln > Blätter > Früchte	(Ahmed et al., 2015)	

^ahierbei handelt es sich um einen Summenparameter aus CTC, iso-CTC und Epi-iso-CTC; Junge Vegetationsstufe

Legende: TM: Trockenmasse; FM: Frischmasse; CTC: Chlortetracyclin; DOX: Doxycyclin; SMZ: Sulfamethazolin; SDZ: Sulfadiazin; NG: Nachweissgrenze; BG: Bestimmungsgrenze; n. a.: nicht analysiert

Tabelle C-10: Konzentrationen verschiedener Sulfonamide und Tetracycline in Wässern.

Antibiotikum	Maximalkonzentration [µg L ⁻¹]	Literaturangabe
Grundwasser		
Sulfamethazin	0,16 – 0,24	(Batt et al., 2006; Hamscher et al., 2005a; Hirsch et al., 1999; Kolpin et al., 2002)
Sulfamethoxazol	0,41	(Sacher et al., 2001)
Sulfamethoxazol	0,22	(Lindsey et al., 2001)
Tetracyclin	0,13 – 0,4	(Campagnolo et al., 2002; Hamscher et al., 2005b; Krapac et al., 2005)
Oberflächengewässer		
Chlortetracyclin	0,11 – 0,69	(Kolpin et al., 2002; Lindsey et al., 2001; Yang et al., 2004)
Doxycyclin	0,07	(Yang et al., 2004)
Oxytetracyclin	0,15 – 1,34	(Kolpin et al., 2002; Lindsey et al., 2001; Yang et al., 2004)
Tetracyclin	0,11	(Kolpin et al., 2002)
Sulfadimethoxin	0,08 – 15	(Lindsey et al., 2001; Yang et al., 2004)
Sulfamethazin	0,06 – 0,22	(Kolpin et al., 2002; Yang et al., 2004)
Sulfadiazin	4,1	(Boxall and Long, 2005)
Sulfamethoxazol	0,48	(Hirsch et al., 1999)
Trinkwasser		
Sulfamethoxazol	≥ 0,1	(Kemper, 2008; Mückter, 2006)
Abwasser von Kläranlagen		
Chlortetracyclin	0,04	(Zhang et al., 2015)
Doxycyclin	0,09	(Zhang et al., 2015)
Sulfamethazin	0,01	(Díaz-Cruz et al., 2008)
Sulfamethoxazol	0,24	(Díaz-Cruz et al., 2008)
Sulfamethoxazol	2,0	(Hirsch et al., 1999)
Sulfamethoxazol	1,3	(Batt and Aga, 2005)
Sulfamethoxazol	0,07 – 0,4	(Botitsi et al., 2007)
Überlandabfluss (run-off)		
Oxytetracyclin	32	(Kay et al., 2005)