

Abschlussbericht

Entwicklung und Validierung neuer Analysenverfahren zur
Charakterisierung und Qualitätssicherung
landwirtschaftlicher Produktionsmittel und Produkte

Arbeitspaket VI - Analytik und Bewertung von Tierarzneimittelrückständen in ausgewählten organischen Düngestoffen

Projekt-Nr. 92.01

Langtitel: Entwicklung und Validierung neuer Analysenverfahren zur Charakterisierung und Qualitätssicherung landwirtschaftlicher Produktionsmittel und Produkte
Arbeitspaket VI - Analytik und Bewertung von Tierarzneimittelrückständen in ausgewählten organischen Düngestoffen

Kurztitel: Analytische Methodenentwicklung und Qualitätssicherung

Projektleiter: Prof. Dr. Friedrich Schöne

Abteilung: Untersuchungswesen

Abteilungsleiter: Dr. Matthias Leiterer

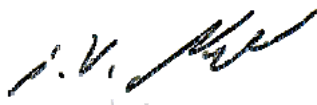
Laufzeit: 01/2012 bis 12/2013

Auftraggeber: Thüringer Ministerium für Landwirtschaft, Forsten, Umwelt und Naturschutz

Bearbeiter: Dr. Karla Tolzin-Banasch
Ralf-Peter Bähr
Dr. Volkmar König
Dr. Matthias Leiterer
Ronald Riedel

Unter Mitwirkung von: Dr. Michael Grün (Food Analytik & Consulting GmbH Jena)
Dr. Martin Hahn (Food GmbH Jena Analytik-Consulting)
Dr. Volker Schulz (Food Analytik & Consulting GmbH Jena)
Dr. Edgar Dänner (Food Analytik & Consulting GmbH Jena)

März 2014



(Präsident)

Prof. Dr. Friedrich Schöne
(Projektleiter)

Copyright:

Diese Veröffentlichung ist urheberrechtlich geschützt.
Alle Rechte, auch die des Nachdrucks von Auszügen und der fotomechanischen Wiedergabe sind dem Herausgeber vorbehalten.

Zusammenfassung

Wirtschaftsdünger, wie Festmist, Gülle, Geflügeltrockenkot, auch in vergorener oder kompostierter Form, sind ein wertvoller Nährstofflieferant in der landwirtschaftlichen Praxis. Die veterinärmedizinische Versorgung in der Tierproduktion bedingt einen Eintrag von antibiotischen Wirkstoffen in diese als organische Dünger eingesetzten Matrices. Auf diesem Weg kann ein Eintrag von Antibiotikawirkstoffen und deren Metaboliten in die Umwelt erfolgen, wo die Wirkstoffe substanzspezifisch eine hohe Persistenz zeigen können.

Anhand eines Antibiotika-Monitorings der Food GmbH Jena Analytik-Consulting aus den Jahren 2009 - 2012 mit 301 Gülle-, Mist- und Gärrest-Proben wird deutlich, dass die Belastung in Wirtschaftsdüngern hauptsächlich durch Tetracycline und Sulfonamide gegeben ist (Tabelle 1) und Schweinegülle/-mist höhere Konzentrationen als Rindergülle/-mist aufweist. Die Untersuchung 28 ausgewählter Proben aus der Düngemittelverkehrskontrolle (DVK) der TLL 2012 bestätigt diesen Befund. Klärschlämme aus der DVK sind vorrangig mit Humanarzneimitteln belastet, insbesondere Ciprofloxacin. Als ebenfalls kontaminiert haben sich Gärprodukte aus Biogasanlagen mit Gülleinsatz im Monitoring (2009 – 2012) der Food GmbH Jena Analytik-Consulting erwiesen. Die Untersuchung von Biogassubstraten und Gärresten aus dem TLL-Projekt 96.08 „Verfahrenstechnische, ökonomische und umweltseitige Einordnung und Wirkungen der Biogaserzeugung für Thüringer Landwirtschaftsbetriebe“ bestätigt die Kontamination mit Tetracyclinen und Sulfonamiden sowie zusätzlich Lincomycin im Bereich der Biogassubstrate und Gärreste.

Tabelle 1: Umweltrelevanz der Antibiotikagehalte in Gülle, Stallmist und Gärprodukten, Monitoring Food GmbH Jena Analytik-Consulting (2009 - 2012)

Tierarzneimittel	Rindergülle	Rindermist	Schweinegülle	Schweinemist	Gärprodukt unter Einsatz von Schweinegülle
Sulfonamide und Trimethoprim	-	-	++	+	+
Penicilline	-	-	(+)	-	(+)
Macrolide	-	-	-	-	-
Chloramphenicol	-	-	-	-	-
Aminoglycoside	-	-	(+)	-	-
Lincosamide Clindamycin	-	-	-	-	-
Cephalosporine Cephalexin	-	-	-	-	-
Chinolone Enrofloxacin	-	-	(+)	-	(+)
Tetracycline	(+)	(+)	++	++	++

++ hohe Umweltrelevanz, + geringe Umweltrelevanz, - niedrige/keine Umweltrelevanz

Gegenwärtig ist eine Bewertung der vorliegenden Befunde auf rechtlicher Grundlage nicht möglich. Für Tierarzneimittel in Wirtschaftsdüngern, Böden, Futtermitteln und pflanzlichen Lebensmitteln liegen keine Grenzwerte/Höchstgehalte vor. Im Jahr 1998 wurden jedoch durch die European Medicines Agency (EMA, vormals EMEA) Schwellenwerte festgelegt, bei deren Überschreitung eine potentielle Umweltrelevanz der betrachteten Wirkstoffe zu erwarten und weitere Untersuchungen erforderlich sind. Sie lagen für Rückstände von Tierarzneimitteln in Wirtschaftsdüngern bei 0,1 mg/kg Frischsubstanz. Diese Vorgaben der EMA-

Richtlinie EMEA/CVMP/055/96-FINAL wurden durch die Richtlinie CVMP/VICH/592/98-FINAL ersetzt, die keine entsprechenden Schwellenwerte für Rückstände von Tierarzneimitteln in Wirtschaftsdünger mehr enthält. Diese Vorgehensweise zeigt, dass die Gesamtproblematik wissenschaftlich noch nicht ausreichend bearbeitet ist. Hilfsweise wird in der vorliegenden Einschätzung der Antibiotikabelastung in Wirtschaftsdüngern trotzdem auf den EMA-Schwellenwert Bezug genommen.

Für die Zulassung neuer Tierarzneimittel ist durch die EMA im Jahr 2008 ein umweltrelevanter Schwellenwert nach Gülleausbringung von 0,1 mg/kg TM im Boden festgelegt.

Die im Rahmen der Untersuchungsprogramme der TLL und der Food GmbH Jena Analytik-Consulting analysierte Schweinegülle enthielt bis zu 46 mg Tetracycline/kg OS¹ (Tab. A14) und 30 mg Sulfonamide und Trimethoprim/kg OS (Tabelle A3). Gärreste waren mit maximal 3,5 mg/kg Sulfonamiden/Trimethoprim sowie maximal 11 mg/kg Tetracyclinen kontaminiert (Tabelle A5). Die worst case Abschätzung der dadurch entstehenden maximalen Belastung im Boden durch die Ausbringung von 32 m³ Schweinegülle pro Hektar und Jahr ergibt mit $PEC_{soil} = 0,42$ mg/kg für Tetracycline bzw. 0,27 mg/kg für Sulfonamide/Trimethoprim eine Überschreitung des EMA-Schwellenwertes im Oberboden. Für Gärprodukte konnte bei einer Ausbringungsmenge von 42 m³ nur für Tetracycline eine mögliche Überschreitung des EMA-Schwellenwertes abgeleitet werden.

Für Rindergülle wurde keine Überschreitung des EMA-Schwellenwertes bei den gefundenen Konzentrationen errechnet.

Im Jahr 2012 wurde in der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft ein Gefäßversuch zur Antibiotika-Aufnahme von Winterweizen aus Gülle-gedüngtem Boden durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass ein Transfer bestimmter Wirkstoffe in die jungen Pflanzen bei sehr hohen Ausgangskonzentrationen in der Gülle möglich ist. Zum Erntezeitpunkt konnten jedoch weder in der Pflanze noch im Korn die applizierten antibiotischen Wirkstoffe detektiert werden.

Der von der Food GmbH Jena Analytik-Consulting im Jahr 2013 durchgeführte Gefäßversuch mit nativ belasteter Gülle kommt zu einem vergleichbaren Resultat. Es wird trotz hoher Konzentrationen an Tierarzneimitteln im Boden kein Transfer in das Korn beobachtet.

Unter praxisüblichen Bedingungen ist die Antibiotika-Belastung von pflanzlichen Lebensmitteln aufgrund der Ergebnisse des Gefäßversuchs und früherer Studien anderer Arbeitsgruppen als gering einzuschätzen.

Die Ergebnisse beider Gefäßversuche belegen, dass durch Lagerung und damit einhergehenden Alterungsprozessen eine Verminderung der Antibiotikakonzentrationen in Gülle und Boden stattfindet. Im Zusammenhang mit dem wiederholten Eintrag von Antibiotika über Wirtschaftsdünger in Böden und die aquatischen Systeme im subinhibitorischen Konzentrationsbereich wird jedoch ein Risiko für die Entstehung antibiotikaresistenter Bakterien (z.B. MRSA², ESBL³-bildende Keime, VRE⁴, CPE⁵) und damit die Verbreitung von Resistenzgenen in der Umwelt diskutiert.

¹ OS: Originalsubstanz

² MRSA – Methicillin resistente *Staphylococcus aureus*

³ ESBL – extended-spectrum beta-lactamases

⁴ VRE - Vancomycin-resistente Enterokokken

⁵ CPE - Carbapenemase produzierende Enterobakterien

Analytische Methoden zur Bestimmung von Antibiotika in Böden, Klärschlämmen, Gülle und Gärresten sind noch nicht harmonisiert und standardisiert. Multimethoden zur gleichzeitigen Erfassung mehrerer Wirkstoffe sind aufgrund der strukturellen Vielfalt der Analyten nur eingeschränkt einsetzbar. Es zeichnet sich deutlich ab, dass aufgrund der chemischen Eigenschaften der einzelnen Wirkstoffe/Wirkstoffklassen auf die Matrix-Wirkstoffkombination angepasste Methoden zur exakten Quantifizierung entwickelt werden müssen.

1. Aufgabenstellung

Im Rahmen des Projekts 92.01 (2012 – 2013) war die TLL mit folgenden Fachaufgaben beauftragt:

- Entwicklung und Validierung geeigneter Analysenverfahren zur Charakterisierung von Veterinärantibiotikarückständen in organischen Düngemitteln, Böden, Pflanzen und Futtermitteln
- Sondierung des Veterinärantibiotikastatus in Thüringen eingesetzter Wirtschaftsdünger anhand der amtlichen Proben aus der Düngemittelverkehrskontrolle sowie Gärresten und Substraten aus Biogasanlagen

Die Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Food GmbH Jena Analytik-Consulting durchgeführt.

Die Arbeiten der Food GmbH Jena Analytik-Consulting zur analytischen Methodenentwicklung und Validierung qualifizierter / robuster Multimethoden und hochempfindlicher Einzelverfahren für die Bestimmung von Antibiotikarückständen in verschiedenen Matrices sowie zum Antibiotikatransfer in der Nahrungskette Boden-Pflanze-Tier-Mensch werden zusätzlich im Rahmen eines Projektes durch die TAB finanziell gefördert.

2. Einleitung

Antibiotika sind zu einem Großteil von Naturstoffen abgeleitete und funktionalisierte antimikrobiell wirksame Substanzen. Die Koexistenz zwischen antibiotisch wirkenden Naturstoffen und zugehörigen Resistenzgenen ist für einen Zeitraum von 30.000 Jahren belegt (D’COSTA ET AL. 2011). Seit es antibiotisch wirkende Stoffe gibt, gibt es auch resistente Bakterien, da die Resistenz einen Wachstumsvorteil unter Selektionsdruck darstellt. Die Resistenzentwicklung ist also kein neuer Aspekt in der Menschheitsgeschichte. Vielmehr bedingt die deutliche Zunahme der Konzentration an antimikrobiellen Wirkstoffen in der Umwelt (Böden, Wirtschaftsdünger, Klärschlämme, Flüsse, etc.), wie er durch die intensive landwirtschaftliche Nutztierhaltung mit Antibiotika-Einsatz sowie erhöhten Einsatzmengen im Humanbereich hervorgerufen wird, eine verstärkte Resistenzentwicklung mit möglichen negativen Auswirkungen für die Therapie bei Mensch und Tier.

Antibiotika im Humanbereich

Resistenzgene treten ubiquitär auf und können jederzeit mobilisiert werden. Nach der Einführung von Methicillin im Jahr 1959 traten 1961 auch erste Methicillin-resistente-

Staphylococcus aureus (MRSA) auf (ENRIGHT ET AL. 2002). Seitdem Methicillin aus dem Handel genommen wurde, geht die Abundanz resistenter Isolate zurück.

Das European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) veröffentlicht im European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-net) jährlich einen Resistenzatlas, in dem die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen im Humanbereich in Europa zusammen gestellt wird. Der prozentuale Anteil der MRSA-Isolate geht deutlich zurück, hat aber angesichts eines populationsgewichteten Mittelwerts der Länder von 17,8 % weiterhin eine hohe Priorität im Gesundheitsmanagement (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL 2013). Ein signifikanter Anstieg hingegen ist bei den Vancomycin resistenten Enterokokken (VRE) und Extended-spectrum-beta-lactamase (ESBL) – bildenden Enterobakterien zu verzeichnen. In der Konsequenz werden häufiger Carbapeneme eingesetzt, wodurch die Inzidenz der Carbapenemase produzierenden Enterobakterien (CPE) dramatisch zugenommen hat (BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG 2013). Im Bericht zum Resistenzgeschehen 2012 in Europa wird deutlich auf die Zunahme von kombinierten Resistenzen (gegen zwei und mehr Antibiotika) bei *Klebsiella pneumoniae* und *Escherichia coli* verwiesen.

In Europa zeichnet sich von Nord nach Süd und von West nach Ost ein zunehmendes Resistenzgeschehen ab. Die Unterschiede können auf ein unterschiedliches Gesundheitsmanagement der Länder in Bezug auf Infektionsmanagement und Verschreibungspraktiken zurück zu führen sein, welche die Eckpunkte einer wirkungsvollen Antibiotikaminimierungsstrategie darstellen (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL 2013).

Antibiotika im Veterinärbereich

Grundlegende Datenerhebungen zur Antibiotikaabgabe in der Veterinärmedizin werden durch die DIMDI-AMV⁶ vom 24.02.2010 geregelt. Im Jahr 2012 sind die Abgabemengen der Tierarzneimittel im Vergleich zum Jahr 2011 um 87 Tonnen gesunken (Tabelle 2). Die Antibiotikaabgabe in der Veterinärmedizin betrifft insbesondere ältere Wirkstoffe wie Tetracycline und Penicilline. Die als Reserveantibiotika in der Humanmedizin eingesetzten Fluorchinolone und Cephalosporine der 3. und 4. Generation werden zwar nur in geringen Mengen abgegeben, allerdings stieg die Abgabemenge von Fluorchinolonen um 2 Tonnen im Jahr 2012 an (PRESSEINFORMATION DES BVL VOM 11.11.2013)

Die Erhebung der Antibiotikaabgabe lässt keine Zuordnung auf einzelne Tierarten zu, da die Mehrzahl der Präparate für die Anwendung bei mehreren Tierarten zugelassen ist. Deshalb wurde ergänzend dazu eine Studie zur Antibiotika-Verbrauchsmengen-Erfassung (VetCAb⁷) durchgeführt, um eine Erfassung der Einzelgaben je Tierart sowie der Therapiehäufigkeiten zu ermöglichen (VAN RENNINGS ET AL. 2013). Dabei wird deutlich, dass die aufgrund geringer Dosierung mengenmäßig nur gering eingesetzten Wirkstoffe der Fluorchinolone, Lincosamide und Aminoglykoside einen recht erheblichen Anteil der Einzelgaben ausmachen können. Mit der ab 01.04.2014 gültigen 16. AMG-Novelle wird das Ziel verfolgt, den Einsatz von Antibiotika in der Tierproduktion zu reduzieren, um dadurch der Entwicklung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen entgegen zu wirken. Zur Therapie erkrankter Tiere müssen allerdings aus Tierschutzgründen auch weiterhin Antibiotika für die Tiermedizin verfügbar bleiben (BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG 2013). Die Novelle sieht ebenfalls eine Nutzungs-

⁶ DIMDI-AMV - Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information-Arzneimittelverordnung

⁷ VetCAb – Veterinary consumption of antibiotics

einschränkung bei den Reserveantibiotika vor. Dem Tierhaltungsmanagement kommt bei der Antibiotikaminimierung eine entscheidende Bedeutung zu.

Tabelle 2: Abgabemengen von Antibiotika in der Veterinärmedizin nach DIMDI-AMV

Wirkstoffklasse	Abgegebene Menge 2012 [t] (±Veränderung zum Vorjahr)
Tetracycline	566 (+2)
Penicilline	498 (-29,5)
Sulfonamide	162 (-23)
Makrolide	145 (-28)
Polypeptidantibiotika	124 (-3)
Aminoglykoside	40 (-7)
Trimethoprim	26 (-4)
Lincosamide	15 (-2)
Pleuromutiline	18 (+4)
Fluorchinolone	10 (+2)
Fenicole	6 (0)
Cephalosporine (1. und 2. Generation)	5 (+3)
Cephalosporine (3. Generation)	2,5 (+0,5)
Cephalosporine (4. Generation)	1,5 (0)
Fusidinsäure	<1 (0)
Nitrofurane	<1 (0)
Nitroimidazole	<1 (0)
Summe	1.619 (-87)

Antibiotika werden in der Tierhaltung eingesetzt. In Abhängigkeit vom Wirkstoff verlässt ein signifikanter Teil den Körper ohne Metabolisierung und damit einer möglichen Inaktivierung (HARMS 2006; HIRSCH ET AL. 1999). Zudem können auch die Metabolite pharmakologisch relevante Eigenschaften besitzen.

Gülle, Festmist und Gärreste als wertvolle Wirtschaftsdünger, wie auch Klärschlämme, werden auf die Felder aufgebracht. Dort unterliegen die Antibiotika bedingt durch bodenphysikalische, bodenchemische und bodenbiologische Prozesse Akkumulations- bzw. Abbauvorgängen, werden in tiefere Bodenschichten verlagert oder ausgewaschen. Die beobachtete Dissipation vieler Wirkstoffe ist nicht bedingt durch Abbau, sondern durch Bindung der Moleküle an Bodenpartikel als sogenannte bound residues (KEEN UND MONTFORTS 2012). Nichtsdestotrotz können diese festgelegten Wirkstoffe biologisch verwertbar für Bodenorganismen, z.B. Regenwürmer, sein (KEEN UND MONTFORTS 2012). Für Sulfonamide ist eine allgemeine Mobilitätstendenz belegt, wonach sie mit dem Bodenwasser in Richtung Grundwassersohle ausgetragen werden (SCHWAKE-ANDUSCHUS 2009). Tetracycline, Macrolide und Fluorchinolone hingegen weisen eine geringe Mobilität auf und akkumulieren im Boden (ENGELS 2004; KEEN UND MONTFORTS 2012). Enrofloxacin hat sich im Boden als persistent erwiesen (LILLENBERG ET AL. 2010). Bei Tetracyclinen und Enrofloxacin besteht prinzipiell die Gefahr der Anreicherung im Boden bei wiederholter Ausbringung von Wirtschaftsdüngern.

Antibiotika können durch landwirtschaftliche Nutzpflanzen aus dem Boden aufgenommen werden, so dass auf diesem Weg ein Eintrag in die Nahrungskette geschehen kann. Dabei sind nicht die antibiotischen Rückstände an sich kritisch, sondern die mögliche Resistenzentwicklung in Bakterien als Folge des Selektionsdrucks durch die ständige Exposition gegenüber Wirkstoffen im subinhibitorischen Konzentrationsbereich (GULLBERG ET AL. 2011; BAYERISCHE LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT 2006). Es wird angenommen, dass die Ausbringung von Antibiotika belasteter Gülle die Verbreitung von Resistenzgenen in Bakterienpopulationen im Boden stimuliert (JECHALKE ET AL. 2013).

Das Ausmaß des Eintrags von Veterinärantibiotika über den Pfad Gülle-Boden-Nutzpflanzen bzw. Boden-Nutzpflanzen wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen untersucht (BOXALL ET AL. 2006; EGGEN ET AL. 2011; FREITAG ET AL. 2008; GROTE ET AL. 2007; GROTE ET AL. 2009; KANG ET AL. 2013; KUMAR ET AL. 2005; LILLENBERG ET AL. 2010; MIGLIORE ET AL. 2003; SCHWAKE-ANDUSCHUS 2009). Die Untersuchungen ergaben, dass ein Eintrag in die Pflanze erfolgen kann, wenn die Antibiotikabelastung der Gülle hoch ist. Die durchgeführten Untersuchungen haben Modellcharakter und stellen häufig ein worst-case-scenario dar. Es ist daher fraglich, ob sich die Ergebnisse auf reale Belastungssituationen übertragen lassen (landwirtschaftliche Nutzung, Tierbestand, Verabreichungsmengen).

In einer Literaturrecherche des BfR im Jahr 2009 (BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG 2011) wurden Studien zusammengestellt, die Antibiotika in verschiedenen Fruchtarten (z.B. Winterweizen, Porree, Weißkohl, Karotten, Kartoffeln, Stangensellerie, Salat, Raps etc.) nachweisen. Zu den am häufigsten gefundenen Wirkstoffgruppen in pflanzlichen Matrices gehören die Tetracycline, Sulfonamide und Chinolone (FREITAG ET AL. 2008; GROTE ET AL. 2006; GROTE ET AL. 2009; HU ET AL. 2010; KUMAR ET AL. 2005). Des Weiteren wurden vereinzelt auch Wirkstoffe aus der Gruppe der Amphenicole, Diaminopyrimidine und Lincosamide (BOXALL ET AL. 2006; HU ET AL. 2010) analysiert. Die gefundenen Konzentrationen in diesen Studien sind aus Gründen des unterschiedlichen Versuchsdesigns allerdings nicht vergleichbar, schließen aber einen möglichen Eintrag in die menschliche Nahrungskette nicht aus.

Das Monitoring der Jahre 2009 - 2012 der Food GmbH Jena Analytik-Consulting mit 301 Proben ergab, dass die Belastung von Wirtschaftsdüngern hauptsächlich auf Sulfonamide und Tetracycline zurückzuführen ist. Schweinegülle weist mit bis zu 40 mg/kg OS wesentlich höhere Konzentrationen an Tetracyclinen als Rindergülle (max. 0,95 mg/kg OS) auf. Sulfonamide und Trimethoprim wurden in Schweinegülle mit max. 30 mg/kg OS und in Rindergülle mit bis zu 0,05 mg/kg OS gefunden (Tabellen A1-A5).

Klärschlämme, die im Rahmen der Düngemittelverkehrskontrolle 2012 untersucht wurden, waren hauptsächlich mit Humanarzneimitteln, insbesondere Ciprofloxacin mit Maximalkonzentrationen von 0,004 mg/kg OS, kontaminiert.

Im Rahmen des Monitorings der DVK der TLL 2012 untersuchte Gärreste enthielten max. 3,5 mg/kg Sulfonamide und Trimethoprim sowie max. 11 mg/kg Tetracycline. Das Spektrum der gefundenen Wirkstoffe in organischen Düngemitteln spiegelt den Einsatz der Tierarzneimittel in Deutschland laut Tierarzneimittelabgabemengenregister gemäß DIMDI-AMV wider. Den mengenmäßig größten Anteil stellen die Tetracycline, Sulfonamide sowie die Penicilline in der Veterinärmedizin dar.

In einer Studie des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) wurden im Jahr 2009 35 Gärrestproben auf Antibiotikarückstände untersucht. In 80 % der beprobten Gärreste konnten Tierarzneimittelrückstände mit Konzentrationen bis 49 mg/kg TM quantifiziert werden (RATSAK ET AL. 2013).

In den einzelnen Biogasanlagen kommen sehr unterschiedliche Substratgemische zum Einsatz. Im Mittel zeichnen sich die Thüringer Biogasanlagen durch einen hohen Wirtschaftsdüngeranteil aus. Thüringen verfügt über 226 landwirtschaftliche Biogasanlagen an 201 Standorten mit einer installierten elektrischen Leistung von 102 MW (Stand 01.01.2012). Insgesamt werden in diesen Biogasanlagen ca. 55 % der flüssigen und fast 20 % der festen Wirtschaftsdünger sowie Feldfrüchte von 40.000 ha (Mais 20.000 ha, Getreide 12.800 ha, Anweilsilage 6600 ha, ...) und ca. 165.000 t Bioabfälle vergoren. Es ergibt sich aus den landwirtschaftlichen Biogasanlagen ein Anfall von 3,5 Mio. m³ Biogasgülle bzw. Gärrest. Insgesamt steigt durch den Einsatz von nachwachsenden Rohstoffen - auch unter Beachtung des Masseabbaus während der Vergärung - bei relativ konstantem Tierbesatz somit der Wirtschaftsdüngeranfall um ca. 12 % in Thüringen auf 7,2 Mio. m³/a. (REINHOLD UND MUMDEY 2012).

Durch die Ausbringung von Antibiotika belasteten Gärresten als Wirtschaftsdünger kann ebenso wie im Fall der Ausbringung von kontaminierten Gülle, Hühnerkot und Stallmist eine Anreicherung von Antibiotika im Boden erfolgen.

Gegenwärtig ist jedoch eine Bewertung der vorliegenden Befunde auf rechtlicher Grundlage nicht möglich. Für Tierarzneimittel in Wirtschaftsdüngern, Böden, Futtermitteln und pflanzlichen Lebensmitteln liegen keine Grenzwerte/Höchstgehalte vor. Im Jahr 1998 wurden jedoch durch die European Medicines Agency (EMA, vormals EMEA) Schwellenwerte festgelegt, bei deren Überschreitung eine potentielle Umweltrelevanz der betrachteten Wirkstoffe zu erwarten und weitere Untersuchungen erforderlich sind. Sie lagen für Rückstände von Tierarzneimitteln in Wirtschaftsdüngern bei 0,1 mg/kg Frischsubstanz. Diese Vorgaben der EMA-Richtlinie EMEA/CVMP/055/96-FINAL wurden durch die Richtlinie CVMP/VICH/592/98-FINAL ersetzt, die keine entsprechenden Schwellenwerte für Rückstände von Tierarzneimitteln in Wirtschaftsdünger mehr enthält (EUROPEAN MEDICINES AGENCY 2000). Diese Vorgehensweise zeigt, dass die Gesamtproblematik wissenschaftlich noch nicht ausreichend bearbeitet ist. Hilfsweise wird in der vorliegenden Einschätzung der Antibiotikabelastung in Wirtschaftsdüngern trotzdem auf den früheren EMA-Schwellenwert Bezug genommen.

Im Jahr 2008 wurde für die Zulassung neuer Tierarzneimittel in der EMA-Richtlinie EMEA/CVMP/418282/2005-Rev.1 ein umweltrelevanter Schwellenwert nach Gülleausbringung von $PEC_{\text{soil}} = 0,1 \text{ mg/kg TM}$ im Boden festgelegt (EUROPEAN MEDICINES AGENCY 2008).

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Antibiotikastatus in Thüringen eingesetzter organischer Düngemittel (Untersuchungsergebnisse 2013)

Die im Zwischenbericht (TOLZIN-BANASCH ET AL. 2013) zusammengefassten Statusuntersuchungen für Thüringen wurden im Bereich der Biogassubstrate und Gärreste durch die Analyse von Proben aus dem TLL-Projekt 96.08 „Verfahrenstechnische, ökonomische und umweltseitige Einordnung und Wirkungen der Biogaserzeugung für Thüringer Landwirtschaftsbetriebe“ (Projektleiter: Dr. Reinhold) ergänzt. Es wurden 31 Wirtschaftsdünger- (7 Hühnertrockenkot, 4 Mischgülle, 18 Schweinegülle, 1 Gärprodukt, 1 Perkolat) und 52 Gärrestproben auf Rückstände von Veterinärantibiotika analysiert.

Die Probennahme der Substrate und Gärreste erfolgte am gleichen Tag, d.h. dass eine direkte Korrelation zwischen den Antibiotikafunden in den Substraten und Gärresten nicht besteht. Die Antibiotikafunde in den Gärresten beziehen sich auf zuvor eingesetzte Substrate, deren Antibiotikastatus in der vorliegenden Untersuchung nicht bestimmt wurde. Die Zusammensetzung der zur Vergärung kommenden Substrate in den einzelnen Biogasanlagen ist jedoch relativ konstant, so dass bei der Auswertung auf die dargestellte Zusammensetzung in Tabelle A13 Bezug genommen wird. Die Verweildauer der Substrate variiert in den verschiedenen Biogasanlagen und beträgt im Mittel der beprobten Anlagen 50 Tage im Fermenter bzw. 90 Tage im Fermenter plus Nachgärer (Verweildauer_{min} = 30 d, Verweildauer_{max} = 360 d).

Methoden

Das untersuchte Spektrum umfasst 25 Wirkstoffe verschiedener Klassen (Tetracycline, Sulfonamide, Diaminopyrimidine, Macrolide, Lincosamide, Pleuromutiline). In einem Screening-Schritt wurde die Anwesenheit von antibiotischen Kontaminanten erfasst. Die Quantifizierung erfolgte über Standardaddition.

Probenvorbereitung und Messung:

1,5 g gefriergetrocknete Probe wurden mit 25 ml McIlvaine-Puffer, pH 4, extrahiert. 15 ml Extrakt wurden auf eine C₁₈-SPE-Kartusche gegeben, die Kartusche mit 3x2 ml H₂O/MeOH=98/2 gewaschen und mit 3 ml MeOH eluiert. Anschließend wurde auf ACN/H₂O=10/90 mit 0,5% HCOOH umgelöst. Die Wiederfindung der Analyten wurde über die Zugabe von Internen Standards (Demeclocyclin für Tetracycline, Sulfadimethoxin-D₆ für Sulfonamide und Roxithromycin für Macrolide) zur Einwaage überwacht. Die Messung erfolgte über LC-MS-MS. Im Anschluss an das Screening wurden die nachgewiesenen Antibiotika über Standardaddition quantifiziert. Als angestrebte Dotierlevel wurden 50 %, 100 % und 300 % des geschätzten Gehalts in die Einwaage addiert. Die Probenvorbereitungsschritte entsprechen denen des Screenings, wobei Einwaagen, Aufgabe- und Elutionsvolumina der SPE, Verdünnungsschritte und Injektionsvolumina an den geschätzten Gehalt angepasst wurden.

Auswertung und Diskussion

In Tabelle 3 sind die Nachweishäufigkeiten sowie maximale Belastungssituationen zusammen gestellt. Die Belastungssituationen der untersuchten Substrate (Schweinegülle, Mischgülle, Hühner trockenkot, Perkolat) bestätigen die Ergebnisse des Monitorings der Food Jena GmbH sowie der untersuchten Proben aus der DVK 2012.

Tabelle 3: Nachweishäufigkeit und analysierte Maximalkonzentration der Wirkstoffe in 31 Substrat- und 52 Gärrestsproben (Darstellung nach Ratsak et al.)

Wirkstoffklasse	Wirkstoff	Substratproben		Gärrestsproben	
		Nachweishäufigkeiten ¹	Maxima [mg/kg FM]	Nachweishäufigkeiten	Maxima [mg/kg FM]
Tetracycline	Tetracyclin ²	22	11,5	24	4,2
	Oxytetracyclin ²	16	1,1	12	0,2
	Chlortetracyclin ²	9	40,9	5	2,1
	Doxycyclin	10	5,5	9	0,5
Sulfonamide	Sulfadiazin	4	0,3	11	0,008
	Sulfamethoxazol	1	2,2	0	-
	Sulfadimidin	3	0,2	8	0,2
	Sulfachlorpyridazin	0	-	0	-
	Sulfadoxin	3	0,004	0	-
	Sulfamethoxyypyridazin	0	-	0	-
	Sulfathiazol	1	0,005	3	0,02
	Sulfaclozin	0	-	0	-
	Sulfadimethoxin	1	0,07	0	-
	Sulfaquinoxalin	0	-	0	-
	Diaminopyrimidine	Trimethoprim	3	0,3	0
Macrolide	Spiramycin	0	-	0	-
	Tilmicosin	6	3,3	1	0,05
	Erythromycin	0	-	0	-
	Josamycin	0	-	0	-
	Tylosin	5	0,7	0	-
Pleuromutiline	Tiamulin	8	0,08	5	0,04
Lincosamide	Lincomycin	7	2,9	17	0,2
Ohne nachweisbare Antibiotikarückstände		5	-	15	-

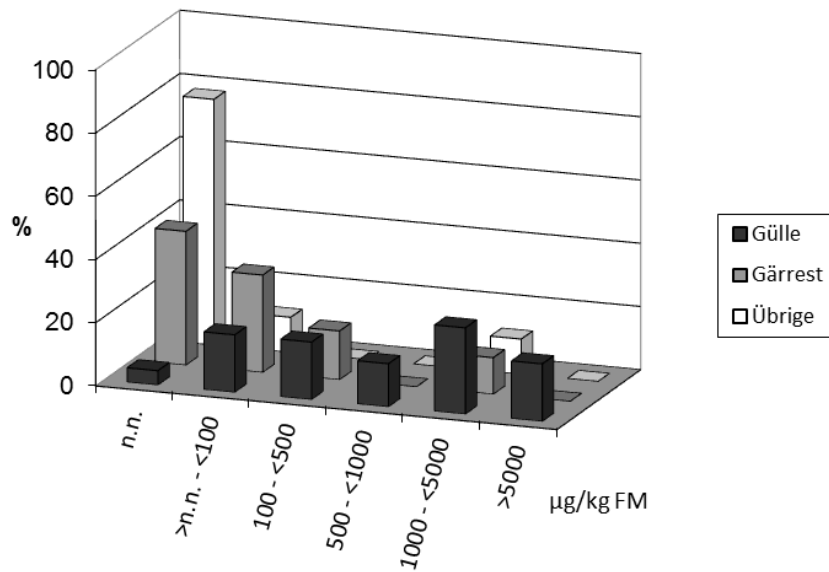
¹ nach Entscheidung 2002/657/EG der Kommission vom 14. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen gilt ein Stoff dann als nachgewiesen, wenn zwei massenspektrometrische Übergänge je Analyt vorhanden sind und das Signal-Rausch-Verhältnis $\geq 3:1$ beträgt. In Abhängigkeit von Wirkstoff, Matrix und Trockenmasse beträgt die Nachweisgrenze 0,1-10 $\mu\text{g/kg FM}$.

² Summenbildung mit Epimeren

In 16 % der Substratproben und 29 % der Gärreste konnten keinerlei Antibiotikarückstände nachgewiesen werden. In den übrigen Proben wurden Rückstände von Tetracyclinen, Sulfonamiden und Lincomycin, sowie in geringerem Ausmaß Diaminopyrimidine, Macrolide und Pleuromutiline gefunden, wobei insbesondere in Schweine- und Mischgülle multiple Wirkstoffnachweise mit bis zu acht verschiedenen Substanzen auftraten. 77 % der untersuchten Gülle wiesen Tetracyclinegehalte $>0,1 \text{ mg/kg FM}$ ⁸ auf. Nur 9 % der Gülleproben wiesen Sulfonamidgehalte $>0,1 \text{ mg/kg FM}$ auf. Die Belastung bei den Gärresten ist, bedingt durch antibiotikakontaminierte Substrate, ebenfalls durch Tetracycline, Sulfonamide und Lincomycin gegeben. In einer Gärrestprobe wurden sieben verschiedene Wirkstoffe nachgewiesen. 27 % der Proben wiesen Tetracyclinegehalte $>0,1 \text{ mg/kg FM}$ auf. Nur 2 % der Gärrestproben wiesen Sulfonamidgehalte $>0,1 \text{ mg/kg FM}$ auf (Abbildung 1).

⁸ EMA-Schwellenwert 1998

Tetracyclinkontamination in Wirtschaftsdünger



Sulfonamidkontamination in Wirtschaftsdünger

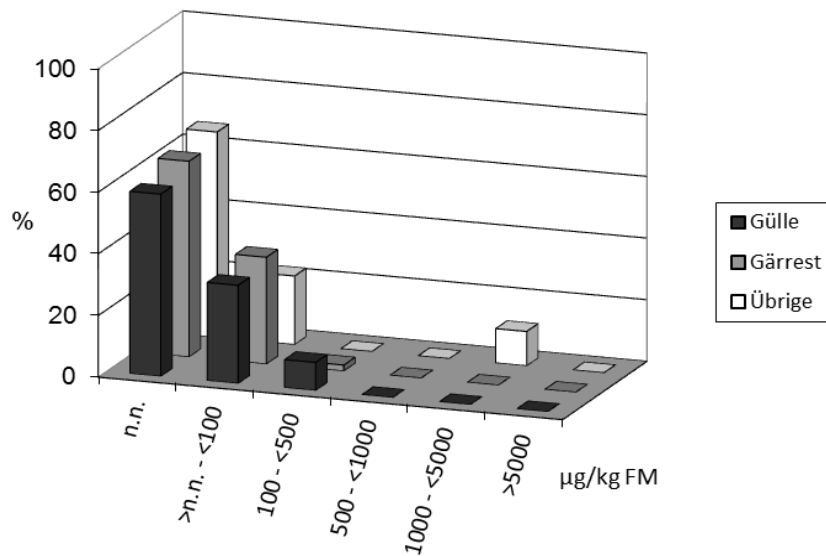


Abbildung 1: Klassifizierung der Tetracyclin- und Sulfonamidkonzentrationen in Wirtschaftsdüngerproben (Übrige: Hühnertrockenkot, Gärprodukt, Perkolat)

Im Mittel⁹ waren die untersuchten Biogassubstrate mit 3,3 mg/kg FM Tetracyclinen und 0,1 mg/kg FM Sulfonamiden kontaminiert. In den Gärresten konnten im Mittel der untersuchten Proben 0,4 mg/kg FM Tetracycline und 0,007 mg/kg Sulfonamiden nachgewiesen werden.

Gärreste aus Biogasanlagen (BGA), die vorrangig Rindergülle (z.B. BGA 15, 28, 33, 66, 114 und 158) oder pflanzliche Substrate (BGA 61, 80 und 106) einsetzen, weisen keine bzw. eine niedrige Antibiotikakontamination auf. In BGAs mit kontaminierter Schweinegülle als Substrat (z.B. BGA 23, 134 und 161) wurden im Vergleich dazu höhere Antibiotikakontaminationen in den Gärresten nachgewiesen. Die Konzentration an Sulfonamiden und Tetracyclinen in den

⁹ Nicht nachweisbare Antibiotikarückstände wurden in diese Berechnung mit 0 mg/kg FM einbezogen

Gärresten waren im Mittel geringer als in den eingesetzten Substraten (Tabellen A13-A14). Die augenscheinliche Verminderung der Konzentration im Verlauf des Gärprozesses ist nicht ausschließlich auf einen Abbau *per se*, sondern ebenfalls auf Verdünnungseffekte durch Vermischung mit anderen Substraten (unbelastete Gülle/Hühnerkot/Stallmist, sowie pflanzlichen Substraten) zurück zu führen.

Die Ausbringung von mit Antibiotika kontaminierten organischen Düngemitteln auf landwirtschaftliche Nutzflächen führt zu einer Kontamination des Bodens. Im Sinne eines worst case – Szenarios können unter Betrachtung aller für Thüringen untersuchten Wirtschaftsdüngerproben aus den Projekten der TLL und der Food GmbH Jena Analytik-Consulting nachfolgende maximale Bodenbelastungen abgeschätzt werden.

Die Bewertung erfolgt unter Zuhilfenahme des von der EMA 2008 festgelegten Schwellenwertes von $PEC_{soil} = 0,1 \text{ mg/kg TM}$ im Boden. Bei Unterschreiten dieser Konzentration wird von keiner Umweltgefährdung ausgegangen. In den folgenden Berechnungen wird außerdem von einem Maximal-Ansatz bei der Düngung ausgegangen.

Modellansatz Schweinegülle (worst case):

- Maximalkonzentration Tetracycline: 46 mg/kg FM
- Maximalkonzentration Sulfonamide/Trimethoprim: 30 mg/kg FM
- N-Sollwert für Silomais: 190 kg N/ha¹⁰
- Abdeckung des N-Bedarfs aus organischen Düngern: max. 75 %
- Pflanzenbauliche N-Wirksamkeit (MDÄ) von Gülle im Ausbringungsjahr: 60 %
- Stickstoffgehalt in Schweinegülle: 7,5 kg N/m³
- Aus dem N-Düngungsbedarf abgeschätzte maximale Aufbringungsmenge: 32 m³/ha und Jahr
- Mittlere Dichte von Boden: 1,4 t/m³
- Mittlere Bearbeitungstiefe: 25 cm

Modellansatz Biogasgülle/Gärrest (worst case):

- Maximalkonzentration Tetracycline: 11 mg/kg FM
- Maximalkonzentration Sulfonamide/Trimethoprim: 3,5 mg/kg FM
- N-Sollwert für Silomais: 190 kg N/ha
- Abdeckung des N-Bedarfs aus organischen Düngern: max. 75 %
- Pflanzenbauliche N-Wirksamkeit (MDÄ) von Biogasgülle im Ausbringungsjahr: 60 %
- Stickstoffgehalt in Biogasgülle: 4,2 kg N/m³¹¹
- Aus dem N-Düngungsbedarf abgeschätzte maximale Aufbringungsmenge: 42 m³/ha und Jahr
- Mittlere Dichte von Boden: 1,4 t/m³
- Mittlere Bearbeitungstiefe: 25 cm

Bei einfacher Ausbringung von hoch kontaminierter Gülle kann aus der worst case – Betrachtung eine Überschreitung des Schwellenwertes für Tetracycline abgeleitet werden ($PEC_{soil} = 0,42 \text{ mg/kg Tetracycline}$). Für Sulfonamide/Trimethoprim ergibt sich ebenfalls eine mögliche Überschreitung des Schwellenwertes ($PEC_{soil} = 0,27 \text{ mg/kg Sulfonamide/ Trimethoprim}$). Bei einmaliger Ausbringung von Gärresten wird der EMA-Schwellenwert im Oberboden bei den Tetracyclinen überschritten ($PEC_{soil} = 0,13 \text{ mg/kg Tetracycline}$), während

¹⁰ ZORN ET AL. 2007

¹¹ REINHOLD ET AL. 2012

für Sulfonamide/Trimethoprim keine Überschreitung abgeleitet werden kann ($PEC_{soil} = 0,04 \text{ mg/kg Sulfonamide/Trimethoprim}$).

Die in der landwirtschaftlichen Praxis durchgeführte wiederholte Ausbringung von Wirtschaftsdünger kann zusätzlich zu einer Akkumulation von Wirkstoffen im Boden führen. Insbesondere Wirkstoffe der Klassen der Tetracycline und Fluorchinolone sind persistent im Boden.

3.2. Gefäßversuch der Food GmbH Jena Analytik-Consulting

Ziel des Versuchs

Der Versuch diente dem Zweck, den Übergang von Tierarzneimitteln aus dem Boden in die Pflanze zu untersuchen. Dazu wurde Weizen auf Böden, die unterschiedlich stark mit einer tierarzneimittelhaltigen Gülle beaufschlagt wurden, angebaut und sowohl der Boden als auch die Pflanzen auf Tierarzneimittel analysiert.

Versuchsaufbau

Die Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft stellte den verwendeten Boden zur Verfügung. Um möglichst authentische Bindungsverhältnisse zu generieren, wurde eine native Schweinegülle verwendet, welche *per se* mit folgenden Tierarzneimitteln belastet war: Sulfadiazin, Acetylsulfadiazin, Tiamulin, Doxycyclin und Chlortetracyclin (Tabelle 4).

Tabelle 4: Konzentration der untersuchten Tierarzneimittel in der eingesetzten Gülle

Wirkstoff	Konzentration [mg/l]
Sulfadiazin	2,8
Acetylsulfadiazin	0,025
Tiamulin	5,9
Doxycyclin	91
Chlortetracyclin	12

Bei den verwendeten Kulturgefäßen handelte es sich um 20 Mitscherlich-Gefäße. In jedes Mitscherlich-Gefäß wurden 6,5 kg getrockneter Boden, 100 ml N-Dünger, 100 ml NPK-Dünger und 400 ml Verdünnungslösung gegeben. Um insgesamt fünf Aufstockungsniveaus zu erreichen, wurden unterschiedliche Mengen der Gülle mit Wasser verdünnt. Da realistische Güllemengen pro kg Boden verwendet werden sollten, wurden gebräuchliche Gülleaufwandmengen für die Berechnung der Volumina an zuzugebender Gülle zugrunde gelegt. Dabei wurde eine Einarbeitungstiefe von 30 cm angenommen. Pro Aufstockungsniveau wurden je vier Gefäße beschickt. Eine Übersicht dazu findet sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Gülleaufwandmenge

Gefäße	zugesezte Güllemenge absolut	entspricht Gülleaufwandmenge
239 - 242	0 ml	0 m ³ /ha
243 - 246	43 ml	30 m ³ /ha
247 - 250	65 ml	45 m ³ /ha
251 - 254	87 ml	60 m ³ /ha
255 - 258	130 ml	90 m ³ /ha

Die erste Probenahme erfolgte direkt nach der Vermischung des Bodens mit der Gülle am 24.04.2013, die Analyse dieser Proben erfolgte einen Tag später. Proben aus je 2 Gefäßen mit gleicher Aufstockung wurden zu Mischproben zusammengefasst. Diese Proben wurden im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt und nach acht Wochen erneut analysiert. Da einige Analyten in den Kühlschrank-gelagerten Proben nicht mehr nachzuweisen waren, wurden am 24.07.2013 Zwischenproben direkt aus den Mitscherlich-Gefäßen entnommen. Die letzten Proben wurden direkt zur Ernte am 22./23.08.2013 genommen. Die Analyse umfasste zusätzlich zum Boden Stroh, Spreu, Korn und Wurzel. Die Wurzeln wurden nach der Probenahme in frischem Wasser ausgewaschen und anschließend bei 40 °C getrocknet.

Ergebnisse

Aus der Menge an zugesetzter Gülle und der Konzentration der Tierarzneimittel in der Gülle wurden die theoretischen Werte für die Gehalte der Tierarzneimittel in den Böden berechnet (Tabelle 6). Bei den angegebenen Werten in der handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils vier Mitscherlich-Gefäßen.

Direkt nach der Einmischung der Gülle in den Boden waren - in Bezug auf die theoretischen Gehalte - geringere Tierarzneimittel-Konzentrationen zu finden. Die höchste Wiederfindung mit 74 % wurde für Chlortetracyclin bei einer Gülleaufwandmenge von 30 m³/ha ermittelt, die Wiederfindungen der anderen Tetracycline lagen deutlich unter 50 %, die der Sulfonamide unter 15 % und die von Tiamulin unter fünf Prozent. Nach der achtwöchigen Lagerung der Erstproben im Kühlschrank waren die Gehalte der geringer konzentrierten Analyten (Sulfadiazin und Acetylsulfadiazin) unter die Nachweisgrenze gesunken. Die Ergebnisse der Zwischenbeprobung bestätigten die Abnahme der Gehalte nach der achtwöchigen Kühlschranklagerung. Tiamulin, welches die dritthöchste Konzentration in der Gülle aufzeigte, war hier nur noch in den am höchsten beschickten Gefäßen nachweisbar. Chlortetracyclin, welches in den im Kühlschrank gelagerten Proben noch durchgängig nachweisbar war, konnte nun nicht mehr nachgewiesen werden. Am Ende des Versuchs war nur noch Doxycyclin in den Bodenproben auffindbar. Während in keinem oberirdischen Teil der Versuchspflanzen Tierarzneimittel gefunden werden konnten, waren Tiamulin und Doxycyclin in den Wurzeln nachweisbar (siehe Tabelle A12).

Diskussion

Im Versuch wurde eine Gülle eingesetzt, die stark mit Tierarzneimitteln belastet war. Schon kurze Zeit nach Einbringung der Gülle in den Boden konnte nur noch ein Teil der Tierarzneimittel nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Zeit wurden zunehmend weniger Tierarzneimittel im Boden gefunden, sowohl im Kulturgefäß als auch in jenen Proben, die im Kühlschrank gelagert wurden. Zur Zwischenbeprobung am 24.07.2013 wurden keine Sulfonamide und kein Chlortetracyclin mehr im Boden gefunden. Erklärungen für das Verschwinden sind zum einen der (biologische) Abbau, zum anderen die Alterung durch Sorption an Bodenbestandteile und damit die Bildung von „bound residues“, wodurch die Tierarzneimittel nicht mehr für die Analytik zugänglich sind. Eine Abreicherung der Analyten durch die Aufnahme über Wurzeln kann als Grund für dieses Verhalten weitgehend ausgeschlossen werden. In den oberirdischen Pflanzenteilen (Stroh, Korn, Spreu) konnten keine Tierarzneimittel gefunden werden. Die beiden am höchsten konzentrierten Tierarzneimittel konnten in den Wurzeln nachgewiesen werden. Dabei war eine Zunahme der Gehalte in der Wurzel mit zunehmender Güllebeaufschlagung festzustellen. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass noch Erde an den Wurzeln anhaftete und die Analysenbefunde daher stammten.

Tabelle 6: Berechnete und experimentell ermittelte Konzentrationen im Boden (Mittelwert n=4)

Gefäße	Theor. Erwartungswerte [µg/kg FM]	1. Messung 24.04. [µg/kg FM]	2. Messung 17.06. [µg/kg FM]	3. Messung 24.07. [µg/kg FM]	4. Messung 22./ 23.08. [µg/kg FM]
Sulfadiazin					
239-242	0	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
243-246	17	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
247-250	26	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
251-254	34	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
255-257	51	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
Acetylsulfadiazin					
239-242	0	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
243-246	0,15	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
247-250	0,22	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
251-254	0,30	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
255-257	0,45	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
Sulfonamide gesamt					
239-242	0	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
243-246	17	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
247-250	26	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
251-254	35	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
255-257	52	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
Tiamulin					
239-242	0	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
243-246	35	0,25	0,09	<0,01	<0,01
247-250	54	0,39	0,22	<0,01	<0,01
251-254	72	0,58	0,19	<0,01	<0,01
255-257	108	0,88	0,91	0,11	<0,01
Doxycyclin					
239-242	0	<1	<1	<1	<1
243-246	550	159	31	21	21
247-250	830	239	62	29	28
251-254	1120	319	63	34	46
255-257	1670	369	98	52	68
Chlortetracyclin					
239-242	0	<1	<1	<1	<1
243-246	73	54	15	<1	<1
247-250	109	39	22	<1	<1
251-254	148	61	30	<1	<1
255-257	220	69	45	<1	<1
Tetracycline gesamt					
239-242	0	<1	<1	<1	<1
243-246	623	213	47	21	21
247-250	939	278	84	29	28
251-254	1268	380	92	34	46
255-257	1890	439	143	52	68

Somit konnte ein Transport von Tierarzneimitteln aus dem Boden in die Pflanze nicht nachgewiesen werden. Da solch hohe Gehalte an Tierarzneimitteln im Boden unter den Bedingungen guter landwirtschaftlicher Praxis kaum vorkommen, ist ein Übergang von Tierarzneimitteln aus dem Boden in die Pflanze in der Regel als unwahrscheinlich zu betrachten. Die Versuchsbedingungen stellen in gewissem Maße ein worst-case-Szenario dar: Die Belastung der Böden mit Tierarzneimitteln ist relativ hoch gewählt. Zudem ist die Durchwurzelung des Bodens in den Gefäßen stärker als es im Freiland der Fall wäre. Daher ist die Aufnahme von Tierarzneimitteln im Gefäßversuch eher begünstigt als im Freiland.

Die Ergebnisse des von der Food GmbH Jena Analytik-Consulting durchgeführten Gefäßversuchs sind konsistent mit denen des von der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft 2012 durchgeführten Gefäßversuchs (TOLZIN-BANASCH ET AL. 2013). Die höheren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in den Ergebnissen des Gefäßversuchs 2012 sind durch die messtechnische Ausstattung bedingt und erfordern eine Optimierung der Anreicherungs- methode (Tabellen A6-A10).

Tetracycline weisen eine hohe Persistenz im Boden auf und waren im Prüfglied mit der höchsten Antibiotikakonzentration (5 mg/kg FM Gülle) nach der Gülle-Applikation zum Erntezeitpunkt noch quantifizierbar. In beiden Gefäßversuchen lagen die mit der Gülle in den Böden eingebrachten Sulfonamide nach 2 bzw. 3 Monaten unterhalb der Nachweisgrenze. Tiamulin war bei den Zwischenprobenahmen nach 2 bzw. 3 Monaten nur in der höchsten applizierten Güllekonzentration noch quantifizierbar. Zum Erntezeitpunkt waren im Gefäßversuch 2012 nur Tetracyclin und Trimethoprim im Boden quantifizierbar. Dieses Ergebnis wird vom Gefäßversuch 2013 für Tetracyclin bestätigt, während Trimethoprim 2013 nicht untersucht wurde.

Ein Transfer in die junge Pflanze (nach 2 Monaten) konnte im Gefäßversuch 2012 für Lincomycin und Tiamulin bei der höchsten applizierten Konzentration (140 µg/kg FM Boden) nachgewiesen werden. Zum Erntezeitpunkt konnte allerdings weder in der Pflanze noch im Korn ein Tierarzneimittelrückstand detektiert werden.

Im Gefäßversuch 2013 konnte kein Transfer der untersuchten Wirkstoffe in die oberirdischen Pflanzenteile und das Korn nachgewiesen werden.

3.3. Laborvergleichsuntersuchung Boden

Die Labore der Food GmbH Jena Analytik-Consulting, der Staatlichen Betriebsgesellschaft für Umwelt und Landwirtschaft Nossen und der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft Jena führten im Jahr 2013 eine Laborvergleichsuntersuchung zur Bestimmung von Antibiotika in Böden durch. Ein von der TLL Jena bereit gestellter Boden wurde mit 19 Wirkstoffen verschiedener Klassen (Tetracycline, Sulfonamide, β -Lactame, Macrolide, Fluorchinolone, Phenicole, Trimethoprim, Lincomycin und Tiamulin) auf den Niveaus 10 µg/kg und 100 µg/kg dotiert. Die Probenvorbereitung erfolgte nach einem Protokoll der Food GmbH Jena Analytik-Consulting (PA 743: Bestimmung von Tierarzneimitteln in Gülle). Die flüssigchromatographische Analyse mit massenspektrometrischer Detektion wurde nach laborspezifischen Methoden durchgeführt.

Die Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchung sind in Tabelle 7 zusammen gestellt.

Tabelle 7: Ergebnisse der Vergleichsuntersuchung zur Bestimmung von Antibiotika in Böden. Mittlere Wiederfindungsraten der teilnehmenden Labore und relative Standardabweichungen (n=5).

Wirkstoffklasse	Wirkstoff	Wiederfindungsraten [%] (Standardabweichung [%] n=5)	
		10 µg/kg	100 µg/kg
Tetracycline	Tetracyclin	72 (2), 54 (22), 98 (18)	68 (5), 52 (8), 71 (6)
	Oxytetracyclin	78 (1), 78 (15), 91 (12)	81 (3), 70 (6), 73 (5)
	Chlortetracyclin	79 (8), 107 (33), 88 (10)	77 (7), 65 (14), 66 (4)
	Doxycyclin	81 (8), 132 (78), 103 (7)	86 (3), 82 (16), 70 (5)
Sulfonamide	Sulfadiazin	33 (4), 56 (20), 53 (10)	25 (6), 57 (14), 70 (2)
	Sulfadimidin	33 (5), 51 (19), 50 (14)	21 (8), 53 (11), 60 (2)
	Sulfathiazole	34 (8), 65 (14), 43 (10)	15 (15), 52 (10), 37 (3)
Pleuromutiline	Trimethoprim	81 (6), 77 (9), 69 (8)	46 (15), 58 (19), 91 (3)
β -Lactame	Ampicillin	<n.b., 82 (32), 106 (19)	<n.b., 63 (37), 95 (8)
	Amoxicillin	<n.b., 99 (31), 127 (14)	<n.b., 83 (27), 100 (5)
Makrolide	Tylosin	49 (5), 65 (23), 101 (24)	38 (9), 63 (7), 88 (29)
	Erythromycin	<n.b., 151 (53), 9 (19)	7 (36), 76 (16), 8 (10)
Fluorchinolone	Enrofloxacin	<n.b., <n.b., 3 (51)	<n.b., 2 (23), 2 (4)
	Marbofloxacin	<n.b., <n.b., 4 (51)	<n.b., 1 (37), 2 (17)
Lincosamide	Lincomycin	64 (14), 66 (19), 96 (5)	77 (18), 69 (4), 101 (2)
Fenicole	Florfenicol	93 (14), 96 (17), 105 (6)	83 (8), 116 (15), 131 (2)
	Thiamphenicol	81 (8), 73 (22), 76 (4)	71 (9), 77 (11), 113 (3)
	Chloramphenicol	93 (14), 77 (15), 92 (4)	76 (8), 91 (11), 70 (12)
Pleuromutiline	Tiamulin	58 (5), 73 (9), 43 (10)	45 (2), 59 (9), 38 (3)

n.b. nicht bestimmbar nach 2002/657/EG

Als Qualitätsparameter für die Eignung der Methode zur Bestimmung von Antibiotika in Böden wurden >40 % Wiederfindungsrate und <25 % laborinterne Streuung angesetzt. Aufgrund dieser Kriterien hat sich die getestete Methode als geeignet für die Bestimmung von Tetracyclinen und Fenicolen erwiesen. Es wurden mittlere Wiederfindungsraten (WFR) von 64-79 % für die Tetracycline und 79-110 % für die Fenicole erreicht (WFR bei 100 µg/kg). Die laborinternen Streuungen dieser Analyten lagen mit maximal 16 % bei einer Fünffachbestimmung in einem akzeptablen Bereich. Auf die Wirkstoffe abgestimmte Quantifizierungsmethoden müssen dennoch weiter entwickelt werden.

Die untersuchten Fluorchinolone (Enrofloxacin, Marbofloxacin) sind mit der angewendeten Methode nicht zu bestimmen. Die β -Lactame (Amoxicillin, Ampicillin) und Erythromycin konnten mit dieser Methode nicht zufriedenstellend erfasst werden.

Die Entwicklung von Einzelmethode für bestimmte Wirkstoffe/Wirkstoffgruppen in der Matrix Boden ist unerlässlich. In weiteren Schritten muss eine Anpassung des Extraktionsmittels auf den zu bestimmenden Wirkstoff erfolgen, um eine ausreichend quantitative Extraktion zu erreichen. Außerdem ist die Testung zusätzlicher Probenvorbereitungsschritte, z.B. die Extraktreinigung durch eine Festphasenextraktion, notwendig, um Matrixbestandteile abzutrennen und die Salzbelastung durch das Extraktionsmittel im Extrakt zu reduzieren.

4. Ausblick

4.1. Analytik

Antibiotikarückstände in Spuren- und Ultraspurenkonzentrationen unterliegen in den unterschiedlichen Umweltkompartimenten sehr vielfältigen Transport-, Akkumulations- und Metabolisierungsmechanismen, die noch sehr wenig wissenschaftlich geklärt sind. Die Entwicklung und Validierung von Multimethoden, respektive auch Einzelmethode, zur Bestimmung von Antibiotikarückständen in sehr unterschiedlichen und komplexen Matrices (organische Düngemittel, Rückstände aus der Biogaserzeugung, Boden, Pflanze, Futtermittel) ist sehr anspruchsvoll und damit zeit- und personalintensiv. Bundesweit existieren für landwirtschaftliche Matrices noch keine einheitlichen, normierten Analysenverfahren. Da die Analyseergebnisse neben der hohen gesundheitlichen Relevanz zusätzlich eine hohe politische Brisanz haben, müssen Fehlermöglichkeiten (Matrix- und Kontaminationseffekte, Fehlidentifizierungen) mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden.

Im Rahmen des VDLUFA ist die TLL federführend an der Erarbeitung und Validierung einer bundesweit einheitlichen Standardmethode für die Analyse von Veterinärantibiotika in Futtermitteln beteiligt.

4.2. Antibiotikastatus in Thüringen eingesetzter organischer Düngemittel

Im Rahmen des TLL-Projekts 92.01 „Entwicklung und Validierung neuer Analysenverfahren zur Charakterisierung und Qualitätssicherung landwirtschaftlicher Produktionsmittel und Produkte. Arbeitspaket VI - Analytik und Bewertung von Tierarzneimittelrückständen in ausgewählten organischen Düngestoffen“ erfolgt im Jahr 2014 zur Ergänzung der Datenbasis die Probenahme und Untersuchung von 20 Proben Broiler- bzw. Putentiefstreu.

4.3. Weitere offene Fragestellungen

Über die Fortführung der Untersuchungen und Bearbeitung weiterer noch offener Fragestellungen

- Thüringenweite Erfassung der eingesetzten Antibiotika in Abhängigkeit von der Tierart und Haltungsform (TMFSG),
 - Erweiterung der Datenbasis zum Status der in Thüringen eingesetzten Wirtschaftsdünger,
 - Untersuchung eines möglichen Abbaus bzw. einer Metabolisierung von Antibiotikarückständen in Biogassubstraten während des Gärprozesses sowie die Charakterisierung der Auswirkungen einer Antibiotikabelastung auf den Biogasprozess,
 - Entwicklung von Konzepten zur Minderung des Antibiotikaeinsatzes in der Tierproduktion
- ist in Zusammenarbeit der zuständigen Behörden zu entscheiden.

5. Literaturverzeichnis

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (Hg.) (2006): Schweinegülle ? Quelle für potentiell unerwünschte Stoffe? 5. Kulturlandschaftstag. Freising-Weihenstephan.

Boxall, Alistair B. A.; Johnson, Paul; Smith, Edward J.; Sinclair, Chris J.; Stutt, Edward; Levy, Len S. (2006): Uptake of veterinary medicines from soils into plants. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 54, S. 2288–2297.

Bundesinstitut für Risikobewertung (2011): Rückstände pharmakologisch wirksamer Stoffe in Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs - Stellungnahme Nr. 051/2011 des BfR vom 2. November 2011, 02.11.2011.

Bundesinstitut für Risikobewertung (Hg.) (2013): Antibiotikaresistenz in der Lebensmittelkette. BfR-Symposium am 11. und 12. November 2013. Antibiotikaresistenz in der Lebensmittelkette. Berlin, 11. und 12.11.2013. Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). Berlin: BfR Hausdruckerei.

D'Costa, Vanessa M.; King, Christine E.; Kalan, Lindsay; Morar, Mariya; Sung, Wilson W. L.; Schwarz, Carsten et al. (2011): Antibiotic resistance is ancient. In: *Nature* 477 (7365), S. 457–461.

Eggen, Trine; Asp, Tone Normann; Grave, Kari; Hormazabal, Viktor (2011): Uptake and translocation of metformin, ciprofloxacin and narasin in forage- and crop plants. In: *Chemosphere* 85, S. 26–33.

Engels, Heike (2004): Verhalten von ausgewählten Tetracyclinen und Sulfonamiden in Wirtschaftsdünger und Boden. Dissertation. Georg-August-Universität, Göttingen. Fakultät für Agrarwissenschaften.

Enright, M. C.; Robinson, D. A.; Randle, G.; Feil, E. J.; Grundmann, H.; Spratt, B. G. (2002): The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (11), S. 7687–7692.

European Centre for Disease Prevention and Control (2013): Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). European Centre for Disease Prevention and Control. Stockholm.

European Medicines Agency (2000): Guideline on environmental impact assessment (EIAS) for veterinary medicinal products - phase I. CVMP/VICH/592/98-FINAL. European Medicines Agency.

European Medicines Agency (2008): Revised guideline on environmental impact assessment for veterinary medical products in support of the VICH guidelines GL6 and GL38. Hg. v. European Medicines Agency. London.

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. In: *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 3, S. 174–184.

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. In: *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 1, S. 38–50.

Grote, Manfred; Meric, Didem Hanim; Langenkämper, Georg; Hayen, Heiko; Betsche, Thomas; Freitag, Mechthild (2009): Untersuchungen zum Transfer pharmakologisch wirksamer Substanzen aus der Nutztierhaltung in Porree und Weißkohl. In: *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 4, S. 287–304.

Grote, Manfred; Schwake-Anduschus, Christine; Michel, Reinhard; Stevens, Henning; Heyser, Wolfgang; Langenkämper, Georg et al. (2007): Incorporation of veterinary antibiotics into crops from manured soil. In: *Landbauforschung Völkenrode* 57, S. 25–32.

- Grün, Michael, Grün, Manfred (2010): Tierarzneimittelgehalt von Gülle und Stallmist – Zwischenauswertung, Bericht (vertraulich), 11 S.
- Gullberg, Erik; Cao, Sha; Berg, Otto G.; Ilbäck, Carolina; Sandegren, Linus; Hughes, Diarmaid et al. (2011): Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. In: *PLoS Pathog* 7 (7), S. 1–9.
- Harms, Katrin Susanne (2006): Untersuchungen zum Nachweis und Vorkommen von Antibiotika und deren Metaboliten in Schweinegülle. Dissertation. Technische Universität, München. Lehrstuhl für Tierhygiene.
- Hirsch, Roman; Ternes, Thomas; Haberer, Klaus; Kratz, Karl-Ludwig (1999): Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. In: *The Science of the Total Environment* (225), S. 109–118.
- Hu, Xiangang; Zhou, Qixing; Luo, Yi (2010): Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. In: *Environmental Pollution* 158, S. 2292–2298.
- Jechalke, S.; Kopmann, C.; Rosendahl, I.; Groeneweg, J.; Weichelt, V.; Krogerrecklenfort, E. et al. (2013): Increased Abundance and Transferability of Resistance Genes after Field Application of Manure from Sulfadiazine-Treated Pigs. In: *Applied and Environmental Microbiology* 79 (5), S. 1704–1711.
- Kang, Dong Hee; Gupta, Satish; Rosen, Carl; Fritz, Vincent; Singh, Ashok; Chander, Yogesh et al. (2013): Antibiotic Uptake by Vegetable Crops from Manure-Applied Soils. In: *J. Agric. Food Chem.* 61 (42), S. 9992–10001.
- Keen, Patricia L.; Montforts, Mark H. M. M. (2012): Antimicrobial resistance in the environment. Hoboken, NJ: Wiley.
- Kumar, K.; Gupta, S. C.; Baidoo, S. K.; Chander, Y.; Rosen, C. J. (2005): Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. In: *Journal of Environmental Quality* 34, S. 2082–2085.
- Lillenberg, M; Litvin, S V; Nei, L; Roasto, M; Sepp, K (2010): Enrofloxacin and Ciprofloxacin Uptake by Plants from Soil. In: *Agronomy Research* 8 (1), S. 807–814.
- Migliore, Luciana; Cozzolino, Salvatore; Fiori, Maurizio (2003): Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. In: *Chemosphere* 52, S. 1233–1244.
- Ratsak, Christiane; Guhl, Barbara; Zühlke, Sebastian; Delschen, Thomas (2013): Veterinärantibiotikarückstände in Gülle und Gärresten aus Nordrhein-Westfalen. In: *Environ Sci Eur* 25 (1), S. 7.
- Reinhold, Gerd; Mumdey, Andreas (2012): Inhaltsstoffe von Biogassubstraten und Gärresten (Datenblätter). Hg. v. Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft. Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft. Jena.
- Reinhold, Gerd; Zorn, Wilfried; König, Volkmar (2012): Effizienter Einsatz von Gärresten aus Biogasanlagen im Pflanzenbau. Hg. v. Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft. Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft. Jena.
- Schwake-Anduschus, Christine (2009): Untersuchungen zur Aufnahme von Antibiotika durch Nutzpflanzen. Dissertation. Universität Paderborn, Paderborn. Fakultät für Naturwissenschaften.
- Tolzin-Banasch, Karla; Bähr, Ralf-Peter; König, Volkmar; Leiterer, Matthias; Riedel, Ronald (2013): Zwischenbericht: Entwicklung und Validierung neuer Analyseverfahren zur Charakterisierung und Qualitätssicherung landwirtschaftlicher Produktionsmittel und Produkte Arbeitspaket VI - Analytik und Bewertung von Tierarzneimittelrückständen in ausgewählten organischen Düngestoffen. Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft. Jena.

van Rennings, Lisa; von Münchhausen, Christiane; Honscha, Walther; Otilie, Henry; Käsböhrer, Annemarie; Kreienbrock, Lothar (2013): Repräsentative Verbrauchsmengenerfassung von Antibiotika in der Nutztierhaltung - Kurzbericht über die Ergebnisse der Studie "VetCAB-Pilot". Tierärztliche Hochschule Hannover, Universität Leipzig, Bundesinstitut für Risikobewertung.

Zorn, Wilfried; Heß, Hubert; Albert, Erhard; Kolbe, Hartmut; Kerschberger, Manfred; Franke, Günther (2007): Düngung in Thüringen 2007 nach "Guter fachlicher Praxis". Hg. v. Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft (Schriftenreihe Heft 7/2007).