

## Ergebnisbericht

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

# Antibiotikarückstände in Geflügelkot, Geflügelmist und Pelztierkot

Projekt-Nr. 92.01



Langtitel: Entwicklung und Validierung neuer Analysenverfahren zur Charakterisierung und Qualitätssicherung landwirtschaftlicher Produktionsmittel und Produkte  
Antibiotikarückstände in Geflügelkot, Geflügelmist und Pelztierkot

Kurztitel: Analytische Methodenentwicklung und Qualitätssicherung

Projektleiter: Prof. Dr. Friedrich Schöne

Abteilung: Untersuchungswesen

Abteilungsleiter: Dr. Matthias Leiterer

Laufzeit: 01/2014 bis 12/2016

Auftraggeber: Thüringer Ministerium für Infrastruktur und Landwirtschaft

Bearbeiter: Dr. Karla Tolzin-Banasch  
Ralf-Peter Bähr  
Ronald Riedel

Juli 2016



Dr. Armin Vetter  
(Stellv. 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.

## Inhalt

1.	Einleitung .....	4
2.	Ergebnisse und Diskussion .....	6
2.1.	Antibiotikastatus in Thüringen eingesetzter Wirtschaftsdünger aus der Geflügel- und Pelztierhaltung (Untersuchungsergebnisse 2013-2015).....	6
2.2.	Umweltrelevanz.....	9
3.	Literaturverzeichnis .....	11
4.	Anhang.....	11

# 1. Einleitung

Die veterinärmedizinische Betreuung der Nutztierbestände bedingt den Übergang antibiotischer Wirkstoffe in die Exkremate bzw. den Wirtschaftsdünger. Auf diesem Weg kann über die Ausbringung von Gülle, Kot oder Mist ein Eintrag von Antibiotika und deren Metaboliten in die Umwelt erfolgen, wo diese substanzspezifisch eine hohe Persistenz zeigen können. Nicht zu vernachlässigen ist der Eintrag von antibiotischen Wirkstoffen aus der humanmedizinischen Anwendung über die Ausbringung von Klärschlämmen.

Im Boden unterliegen die Antibiotika physikalischen, chemischen und biologischen Akkumulations- bzw. Metabolisierungsvorgängen, werden in tiefere Bodenschichten verlagert oder ausgewaschen. Die beobachtete Dissipation vieler Wirkstoffe ist nicht bedingt durch Abbau, sondern durch Bindung der Moleküle an Bodenpartikel. Nichtsdestotrotz können diese sogenannten *bound residues* biologisch verwertbar für Bodenorganismen, z.B. Regenwürmer, sein (Boxall 2012). Für Sulfonamide ist eine allgemeine Mobilitätstendenz belegt, wonach sie mit dem Bodenwasser in Richtung Grundwassersohle ausgetragen werden (Schwake-Anduschus 2008).

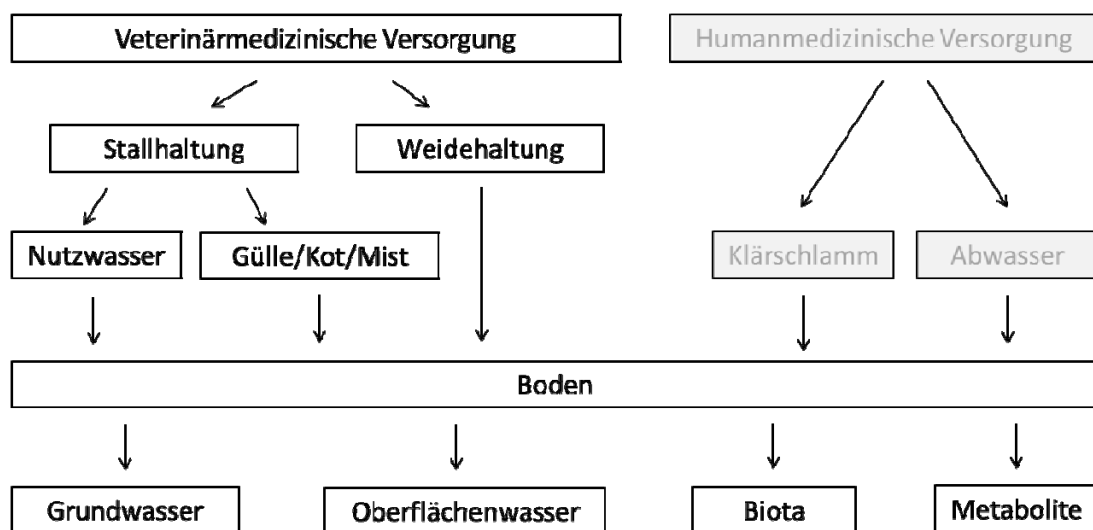


Abbildung 1: Eintrags- und Verteilungspfade der Veterinär- und Humanantibiotika in der Umwelt (nach Boxall 2012)

Geflügelkot mit Einstreu oder ohne Einstreu ist nach Düngegesetz (DüG) vom 9. Januar 2009 als Wirtschaftsdünger tierischer Herkunft einzustufen und unterliegt als Material der Kategorie 2 (hier: unverarbeitete Hühnergülle) den Restriktionen der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 vom 21. Oktober 2009. Neben einer direkten landwirtschaftlichen Nutzung wird ein Teil des Hühnerkotes in Biogasanlagen verarbeitet und nach erfolgter Vergärung verwertet.

Zusätzlich zu den in Thüringen anfallenden Wirtschaftsdüngern wird auch aus anderen Bundesländern Geflügelkot nach Thüringen verbracht. Für den Import aus den Niederlanden ist eine tierseuchenrechtliche Genehmigung vom Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz (TLV) notwendig.

Geflügelkot unterliegt den Vorschriften des Düngerechts. Wirtschaftsdünger tierischer Herkunft dürfen nur so ausgebracht werden, dass die aufgebrachte Menge an Gesamtstickstoff in einem Landwirtschaftsbetrieb 170 kg je Hektar und Jahr nicht überschreitet. In Bezug auf die pflanzenbedarfsgerechte Düngung sind die Vorgaben der Düngeverordnung (DüV) vom 27. Februar 2007 zu berücksichtigen. Nach guter fachlicher Praxis gilt im Herbst eine Aufbringeobergrenze von 80 kg/ha Gesamtstickstoff (N). Insgesamt dürfen jedoch nicht mehr als 40 kg/ha Ammoniumstickstoff (NH<sub>4</sub>-N) aufgebracht werden. Geflügelkot unterliegt nach der Ernte der Sperrfrist, wonach nach dem 01. November eines Jahres keine Düngemittel mit wesentlichem Gehalt an verfügbarem Stickstoff auf Ackerland aufgebracht werden dürfen.

Geflügelkot kann am Feldrand zum Zweck der Ausbringung kurzfristig gelagert werden. Eine längere Lagerung ist nicht zulässig. Auf unbestelltem Ackerland ist Geflügelkot unverzüglich einzuarbeiten. Importe aus den Niederlanden dürfen aus tierseuchenrechtlichen Gründen nicht am Feldrand gelagert werden, sie sind sofort auszubringen und einzuarbeiten.

2015 wurden ca. 7.500 t Geflügelkot aus anderen Bundesländern und Holland importiert<sup>1</sup>. Eine Aufschlüsselung nach Herkunft ist nicht möglich. Zusätzlich wurden 2100 t Pelztierkot importiert. Aus dem Zuchtbericht 2015 - Wirtschaftsgeflügel in Thüringen<sup>2</sup> errechnet sich in Thüringen 2015 ein Anfall von ca. 75.000 t.

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um die Antibiotikabelastung von Wirtschaftsdüngern aus der Geflügel- und Pelztierhaltung abzuschätzen und die Daten des Abschlussberichts (Tolzin-Banasch et al. 2015) zur Antibiotikabelastung in Gül- len, Gärresten und Klärschlämmen zu ergänzen.

---

<sup>1</sup> Quelle: Meldung an die TLL entsprechend Verordnung über das Inverkehrbringen und Befördern von Wirtschaftsdünger (WDüngV) vom 21.07.2010

<sup>2</sup> Bernd Kästner, TLL Jena

## 2. Ergebnisse und Diskussion

### 2.1. Antibiotikastatus in Thüringen eingesetzter Wirtschaftsdünger aus der Geflügel- und Pelztierhaltung (Untersuchungsergebnisse 2013-2015)

Die im Abschlussbericht (Tolzin-Banasch et al. 2015) zusammengefassten Statusuntersuchungen für Thüringen wurden durch die Untersuchung von Proben aus der Geflügel- und Pelztierhaltung ergänzt. Es wurden 37 Proben auf Rückstände von Veterinärantibiotika analysiert.

<b>Matrix</b>	<b>Probenzahl</b>
Hühnertrockenkot	23
Putenmist mit Einstreu	9
Pelztierkot mit Einstreu	2
Hähnchenmist	1
Legehennenkot	1
Hühnermist	1
Summe	37

#### Methoden

Das untersuchte Spektrum umfasst 27 Wirkstoffe verschiedener Klassen (Tetracycline, Sulfonamide, Diaminopyrimidine, Macrolide, Lincosamide, Pleuromutiline, Fluorchinolone). In einem Screening-Schritt wurde die Anwesenheit von antibiotischen Kontaminanten erfasst. Die Quantifizierung erfolgte über Standardaddition. Aufgrund der hohen Konzentrationen an Calcium in den Proben aus der Geflügelhaltung, musste ein alternatives Verfahren zur Probenvorbereitung entwickelt werden. Die Anwesenheit von zweiwertigen Ionen (z.B. Calcium) stört die Extraktion aus der Matrix durch die Bildung von Komplexen mit Wirkstoffen der Gruppe der Tetracycline. Aus diesem Grund wurde eine Methode etabliert, die durch den Einsatz von Komplexbildnern (EDTA, Oxalsäure) die Extraktion aus der Matrix erleichtert. Um die Homogenität der Proben sicherzustellen, wurden sie gefriergetrocknet und anschließend vermahlen. Die Gefrierdrying der Proben schont zugleich temperaturempfindliche Stoffe wie die Tetracycline.

#### Probenvorbereitung und Messung

Die Probenvorbereitung für die Bestimmung der Tetracycline erfolgte getrennt von der Bestimmung der anderen Antibiotika.

Tetracycline: 1,5 g gefriergetrocknete Probe wurden mit einem Gemisch aus MeOH/Wasser, welches Oxalsäure/Zitronensäure enthielt, extrahiert. Anschließend wurde ein Aliquot des Überstandes eingeeengt und in MeOH aufgenommen.

Übrige Antibiotika: 1,5 g gefriergetrocknete Probe wurden mit einem Gemisch aus MeOH/Wasser, welches EDTA enthielt, extrahiert. Anschließend wurde ein Aliquot des Überstandes eingeeengt und in MeOH aufgenommen.

Die Wiederfindung der Analyten wurde über die Zugabe von Internen Standards (Demeclocyclin für Tetracycline, Sulfadimethoxin-D<sub>6</sub> für Sulfonamide und Roxythromycin für Macrolide) zur Einwaage überwacht. Die Messung erfolgte über LC-MS-MS (API4000 QTrap, SCIEX). Im Anschluss an das Screening wurden die nachgewiesenen Antibiotika über Standardaddition quantifiziert. Als angestrebte Dotierlevel wurden 100 %, 200 % und 500 % des geschätzten Gehalts in die Einwaage addiert. Die Probenvorbereitungsschritte entsprechen denen des Screenings.

## Auswertung und Diskussion

In der Hälfte der Proben waren keine Antibiotikarückstände nachweisbar. In den belasteten Proben konnten bis zu vier verschiedene Veterinärantibiotika gleichzeitig nachgewiesen werden. Das Maximum zeigte eine Probe Hühnertrockenkot mit 12 mg/kg FM Tylosin. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die gefundenen Wirkstoffe und Konzentrationen in den untersuchten Proben.

**Tabelle 1: Nachweishäufigkeit und analysierte Maximalkonzentration der Wirkstoffe (Darstellung nach Ratsak et al. 2013)**

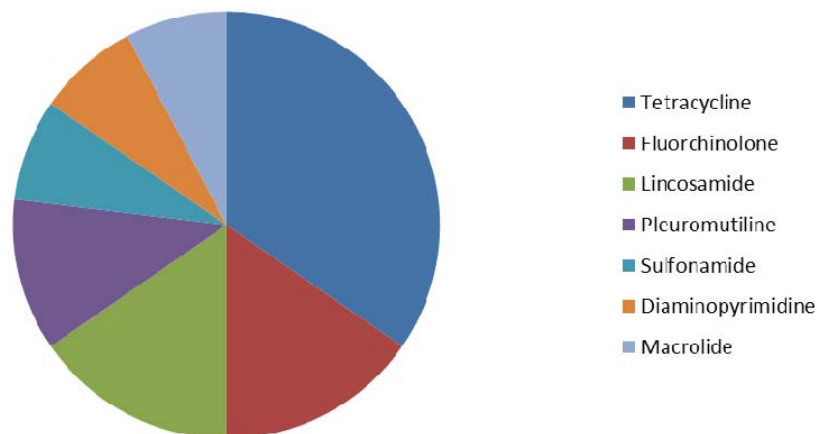
Wirkstoffklasse	Wirkstoff	Nachweishäufigkeit <sup>1</sup>	Maxima [mg/kg FM]	Probenmatrix mit gefundenem Maximum
Tetracycline	Tetracyclin <sup>2</sup>	3	0,005	Pelztierkot mit Einstreu
	Oxytetracyclin <sup>2</sup>	4	0,966	Pelztierkot mit Einstreu
	Chlortetracyclin <sup>2</sup>	0		
	Doxycyclin	6	1,42	Hühnertrockenkot
Sulfonamide	Sulfadiazin	0	0,322	Hühnertrockenkot
	Sulfamethoxazol	1		
	Sulfadimidin	0		
	Sulfachloropyridazin	0		
	Sulfathiazol	0		
	Sulfaclozin	0	0,089	Hühnertrockenkot
	Sulfadimethoxin	0		
	Sulfaquinoxalin	1		
	Sulfadoxin	0		
	Sulfamethoxy-pyridazin	0		
Sulfamerazin	0			
Diaminopyrimidine	Trimethoprim	3	0,551	Hühnertrockenkot
Macrolide	Spiramycin	0	11,9	Hühnertrockenkot
	Tilmicosin	0		
	Erythromycin	0		
	Josamycin	0		
	Tylosin	2		
Pleuromutiline	Tiamulin	3	0,187	Hühnertrockenkot
Lincosamide	Lincomycin	4	1,81	Hühnertrockenkot
Fluorchinolone	Enrofloxacin	4	2,15	Putenmist mit Einstreu
Ohne nachweisbare Antibiotikarückstände		19		

<sup>1</sup> 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 0,0001 - 0,010 mg/kg FM.

<sup>2</sup> Summenbildung mit Epimeren

Die häufigsten Befunde betrafen Wirkstoffe der Klasse der Tetracycline (insbesondere Doxycyclin), gefolgt von Fluorchinolonen (Enrofloxacin) und Lincosamiden (Lincomycin) (Abbildung 2). Tiamulin, Tylosin und Sulfonamide/Trimethoprim wurden vereinzelt quantifiziert, wobei eine Probe Hühnertrockenkot den maximal gefundenen Gehalt von 12 mg/kg FM Tylosin aufwies.

**Nachweishäufigkeiten der analysierten Antibiotikaklassen**



**Abbildung 2: Nachweishäufigkeiten der analysierten Antibiotikaklassen in Proben mit quantifizierbaren Antibiotikarückständen (n=18)**

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 der untersuchten Wirtschaftsdüngerproben nachfolgende maximale Bodenbelastungen abgeschätzt werden.

Die Bewertung erfolgt unter Zuhilfenahme des von der European Medicines Agency (EMA) 2008 festgelegten Schwellenwertes von  $PEC_{soil}^3 = 0,1 \text{ mg/kg}$  im Oberboden (European Medicines Agency 2016). Bei Unterschreiten dieser Konzentration wird von keiner Umweltgefährdung ausgegangen. In den folgenden Berechnungen wird außerdem von einem Maximal-Ansatz bei der Düngung ausgegangen.

Zur Bewertung der Antibiotikafrachten in der landwirtschaftlichen Praxis wurden 11 Chargen Hühnertrockenkot herangezogen. Entsprechend den Laborergebnissen enthalten diese im Mittel 2,56 % Gesamtstickstoff (N) in der OS<sup>4</sup> und 0,32 % Ammoniumstickstoff (NH<sub>4</sub>-N) in der OS.

Fallbeispiel Ausbringung Hühnertrockenkot (ohne Einstreu) im Frühjahr zu Silomais:

- N-Sollwert für Silomais: 190 kg N/ha abzüglich 48 kg N/ha Nmin-Bodengehalt (Quelle: Aktueller Rat zur Nmin - und Smin -Situation in Thüringen im Frühjahr 2016)
- Abdeckung des N-Bedarfs aus organischen Düngern: max. 75 %

<sup>3</sup>  $PEC_{soil}$  Predicted environmental concentration in soil

<sup>4</sup> OS Originalsubstanz



- Pflanzenbauliche N-Wirksamkeit im Ausbringungsjahr: 60 %
- abgeschätzte maximale Aufbringungsmenge: ca. 187 dt/ha
- Mittlere Dichte von Boden: 1400 kg/m<sup>3</sup>
- Mittlere Bearbeitungstiefe: 25 cm
- Maximalkonzentration Tylosin: 12 mg/kg FM

Berechnung:

- 12 mg/kg Tylosin = 224400 mg Tylosin in 18700 kg Wirtschaftsdünger
  - 1 ha Boden, Bearbeitungstiefe 25 cm → 2500 m<sup>3</sup> → 3.500.000 kg Boden
- $PEC_{soil} = 224400 \text{ mg} / 3.500.000 \text{ kg} = 0,06 \text{ mg/kg Tylosin}$

Damit ergibt sich für die Ausbringung von Hühnertrockenkot, welcher 12mg/kg FM Tylosin enthält, keine Überschreitung des Schwellenwertes von  $PEC_{soil} = 0,1 \text{ mg/kg}$ .

Für die zwei Chargen Pelztierkot errechnen sich analog im Mittel Frachten von 82 dt/ha im Herbst und 185 dt/ha im Frühjahr. Damit ergibt sich für die gefundene Maximalkonzentration von Oxytetracyclin von 0,966 mg/kg FM eine Fracht im Frühjahr von  $PEC_{soil} = 0,005 \text{ mg/kg Oxytetracyclin}$ .

Für die drei Chargen Putenmist sind im Mittel Frachten von 98 dt/ha im Herbst und 218 dt/ha im Frühjahr zu bewerten. Damit ergibt sich für die gefundene Maximalkonzentration von Enrofloxacin von 2,15 mg/kg FM eine Fracht im Frühjahr von  $PEC_{soil} = 0,01 \text{ mg/kg Enrofloxacin}$ .

Bei einfacher Ausbringung von kontaminiertem Hühnertrockenkot, Pelztierkot und Putenmist kann aus der worst case – Betrachtung keine Überschreitung der Schwellenwerte für Tylosin, Oxytetracyclin und Enrofloxacin abgeleitet werden. Alle anderen Befunde führen ebenfalls nicht zu einer Überschreitung des EMA-Schwellenwertes.

## 2.2. Umweltrelevanz

Zur Bewertung der theoretisch möglichen Konzentrationen im Boden nach der Applikation von Wirtschaftsdünger können die Verteilungskoeffizienten und Halbwertszeiten herangezogen werden. Je höher der Verteilungskoeffizient und je höher die Halbwertszeit eines Wirkstoffs ist, desto höher ist dessen Persistenz im Boden. Diese Faktoren sind jedoch stark von der jeweiligen Bodenart und Bodenstruktur abhängig. Ein hoher Anteil organischen Kohlenstoffs begünstigt die Bindung an Bodenpartikel, während in sandigen Böden die Wirkstoffe mobiler sind. Auch der pH-Wert des Bodens sowie klimatische Bedingungen, wie Temperatur, Niederschlagsmenge und –intensität können die Auswaschung von Substanzen aus dem Boden fördern (Boxall 2012).

Im Allgemeinen sind Tetracycline und Fluorchinolone im Boden persistent (Rabølle und Spliid 2000; Boxall 2012). Sulfonamide und Trimethoprim hingegen werden leicht in Oberflächen- und Grundwasser ausgetragen (Almeida et al. 2014). Tylosin hat in lehmigen Böden eine erhöhte Sorptionsneigung an Bodenpartikel (Rabølle und Spliid 2000). Die Sorption von Lincomycin an Bodenpartikel wird durch einen hohen pH-Wert begünstigt (Williams et al. 2013). Zu Tiamulin wurde eine Halbwertszeit in Boden von 16 Tagen ermittelt (Schlüsener und Bester 2006). Damit ist diese Substanz nicht persistent. Frisch gedüngter Boden kann hingegen erhöhte Konzentrationen aufweisen (Almeida et al. 2014).

Bei einmaliger Applikation wurde aus den vorliegenden Daten keine Überschreitung des EMA-Schwellenwertes abgeleitet. Die in der landwirtschaftlichen Praxis durchgeführte wiederholte Ausbringung von Wirtschaftsdünger kann jedoch zusätzlich zu einer Akkumulation von Wirkstoffen im Boden führen. Insbesondere Wirkstoffe der Klassen der Tetracycline und Fluorchinolone sind persistent im Boden.

Ein Eintrag von Antibiotika in die Nahrungskette über den Pfad „Veterinärmedizinische Anwendung → Wirtschaftsdünger → Boden → Nutzpflanze“ ist möglich. Aufgrund der Ergebnisse des Gefäßversuchs und früherer Studien anderer Arbeitsgruppen ist jedoch unter praxisüblichen Bedingungen die Antibiotika-Belastung von pflanzlichen Lebensmitteln als gering einzuschätzen (Tolzin-Banasch et al. 2015).

### 3. Literaturverzeichnis

Almeida, Anabela; Duarte, Sofia; Nunes, Ricardo; Rocha, Humberto; Pena, Angelina; Meisel, Leonor (2014): Human and Veterinary Antibiotics Used in Portugal—A Ranking for Ecosurveillance. In: *Toxics* 2 (2), S. 188–225. DOI: 10.3390/toxics2020188.

Boxall, Alistair B. A. (2012): Fate and Transport of Antibiotics in Soil Systems. In: Patricia L. Keen und Mark H. M. M. Montforts (Hg.): *Antimicrobial Resistance in the Environment*. Chichester: John Wiley & Sons, S. 309–324.

European Medicines Agency (2016): Guideline on environmental impact assessment for VMPs in support of the VICH GL6 and GL38. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP)

Rabølle, Mette; Spliid, Niels Henrik (2000): Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. In: *Chemosphere* 40 (7), S. 715–722. DOI: 10.1016/S0045-6535(99)00442-7.

Ratsak, Christiane; Guhl, Barbara; Zühlke, Sebastian; Delschen, Thomas (2013): Veterinary antibiotic residues in manure and digestates in Northrhine-Westfalia. In: *Environ Sci Eur* 25 (1), S. 7. DOI: 10.1186/2190-4715-25-7.

Schlüsener, Michael P.; Bester, Kai (2006): Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil. In: *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* 143 (3), S. 565–571. DOI: 10.1016/j.envpol.2005.10.049.

Schwake-Anduschus, Christine (2008): Untersuchungen zur Aufnahme von Antibiotika durch Nutzpflanzen. Dissertation. Universität Paderborn

Tolzin-Banasch, Karla; Bähr, Ralf-Peter; König, Volkmar; Leiterer, Matthias; Riedel, Ronald (2015): Arbeitspaket VI - Analytik und Bewertung von Tierarzneimittelrückständen in ausgewählten organischen Düngestoffen. Abschlussbericht: Entwicklung und Validierung neuer Analyseverfahren zur Charakterisierung und Qualitätssicherung landwirtschaftlicher Produktionsmittel und Produkte. Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft. Jena

Williams, C. F.; Watson, J. E.; Nelson, S. D.; Walker, C. W. (2013): Sorption/Desorption of lincomycin from three arid-region soils. In: *Journal of environmental quality* 42 (5), S. 1460–1465. DOI: 10.2134/jeq2013.04.0138.

### 4. Anhang

Ergebnisse der Untersuchungen auf Antibiotikarückstände in 37 Proben aus der Geflügel- und Pelztierhaltung (Tabelle 2)

