

Texte

44
04

ISSN
0722-186X

Verhalten von Tetrazyklinen und anderen Veterinär- antibiotika in Wirtschafts- dünger und Boden

**(Wirkung von Tetrazyklinen und
anderen Tierarzneimitteln auf die
Bodenfunktion)**

**Umwelt
Bundes
Amt**



Für Mensch und Umwelt

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT

Forschungsbericht 200 73 248
UBA-FB 000630



Verhalten von Tetrazyklinen und anderen Veterinär- antibiotika in Wirtschafts- dünger und Boden

**(Wirkung von Tetrazyklinen und anderen
Tierarzneimitteln auf die Bodenfunktion)**

von

Dr. Christoph Winckler¹, Heike Engels¹

Dr. Kerstin Hund-Rinke², Dr. Thomas Luckow², Dr. Markus Simon²

Dr. Günther Steffens³

³Landwirtschaftskammer Weser-Ems (LWK-WE)

in Zusammenarbeit mit dem

¹ Forschungs- und Studienzentrum für Veredelungswirtschaft
Weser-Ems (FOSVWE)

und dem

² Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie
(Fraunhofer IME)

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Diese Publikation ist ausschließlich als Download unter
<http://www.umweltbundesamt.de>
verfügbar.

Der Herausgeber übernimmt keine Gewähr
für die Richtigkeit, die Genauigkeit und
Vollständigkeit der Angaben sowie für
die Beachtung privater Rechte Dritter.
Die in dem Bericht geäußerten Ansichten
und Meinungen müssen nicht mit denen des
Herausgebers übereinstimmen.

Herausgeber: Umweltbundesamt
Postfach 33 00 22
14191 Berlin
Tel.: 030/8903-0
Telex: 183 756
Telefax: 030/8903 2285
Internet: <http://www.umweltbundesamt.de>

Redaktion: Fachgebiet IV 2.3
Astrid Wiemann

Berlin, November 2004

Berichts-Kennblatt

1. Berichtsnummer 000074	2.	3.
4. Titel des Berichtes Verhalten von Tetrazyklin und anderen Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden Arbeitstitel: Wirkung von Tetrazyklinen und anderen Tierarzneimitteln auf die Bodenfunktion		
5. Autor(en), Name(n), Vorname(n) Winckler, Christoph; Engels, Heike; Hund-Rinke, Kerstin; Luckow, Thomas; Simon, Markus; Steffens, Günther		8. Abschlussdatum 2. 2004
		9. Veröffentlichungsdatum
6. Durchführende Institution (Name, Anschrift) Landwirtschaftskammer Weser-Ems Mars-la-Tour-Straße 13 26121 Oldenburg		10. UFOPLAN – Nr. 200 73 248
		11. Seitenanzahl 143
7. Fördernde Institution (Name, Anschrift) Umweltbundesamt Postfach 33 00 22 14191 Berlin		12. Literaturangaben 58
		13. Tabellen u. Diagramme 33
		14. Abbildungen 37
15. Zusätzliche Angaben		
16. Kurzfassung In der vorliegenden Studie wurde das Ausscheidungsverhalten von Tetrazyklin bei Mastgeflügel und dessen Persistenz in Festmist während einer dreimonatigen Kompostierung untersucht. Weiterhin wurden die Gehalte an ausgewählten Tetrazyklinen und Sulfonamiden in Schweinegülleproben aus der Praxis erfasst. In einem weiteren Schritt wurde die Mobilität von Tetrazyklin und Sulfadiazin in verschiedenen Böden nach Ausbringung über Gülle geprüft. Schließlich wurde die Etablierung und Stabilität einer spezifischen Tetrazyklinresistenz in Böden mittels der PCR-Methode überprüft. In diesem Untersuchungsschritt wurde auch der Einfluss von Tetrazyklin auf die bakterielle Lebensgemeinschaft sowie die mikrobielle Aktivität im Boden gemessen. Die gewonnen Daten dienen zur besseren Abschätzung des Umweltgefährdungspotentials von Antibiotikaeinträgen aus der Tierproduktion.		
17. Schlagwörter Antibiotika; Ausscheidung; Boden; Persistenz; Resistenz; Sulfonamid; Sickerwasser; Tetrazyklin; Tierarzneimittel; Verlagerung		
18. Preis	19.	20.

Report Cover Sheet

1. Report No. 000074	2.	3.
4. Report Title Behaviour of tetracycline and other veterinary antibiotics in organic fertilizers and soil Working title: Effects of tetracyclines and other veterinary pharmaceuticals on soil		
5. Autor(s), Family Name(s), First Name(s) Winckler, Christoph; Engels, Heike; Hund-Rinke, Kerstin; Luckow, Thomas; Simon, Markus; Steffens, Günther		8. Report Date 2. 2004
		9. Publication Date
6. Performing Organisation (Name, Address) Landwirtschaftskammer Weser-Ems Mars-la-Tour-Strasse 13 26121 Oldenburg		10. UFOPLAN –Ref. No. 200 73 248
		11. No. of Pages 143
7. Funding Agency (Name, Address) Umweltbundesamt Postfach 33 00 22 14191 Berlin		12. No. of Reference 58
		13. No. of Tables, Diagrams 33
		14. No. of Figures 37
15. Supplementary Notes		
16. Abstract In the present study, the elimination behaviour of tetracycline in broiler chicken and its persistence in solid manure during a three months composting period was examined. In addition, the effective concentration of selected tetracyclines and sulfonamides was determined in liquid pig manure samples. In another step, the mobility of tetracycline and sulfadiazine in different soils was tested after spreading liquid manure containing the antibiotics. Finally, the establishment and stability of a specific tetracycline resistance was examined in soils using PCR. In these experiments, also the influence of tetracycline on soil microbiota as well as the soil microbial activity was measured. The results allow an improved environmental risk assessment for antibiotics originating from animal production.		
17. Keywords animal drugs; antibiotics; excretion; leachate; mobility; persistence; resistance; soil; sulfonamide; tetracycline		
18. Price	19.	20.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Glossar	XII
1 Einführung in die Problemstellung und Vorgehensweise.....	1
2 Stand des Wissens	4
2.1 Begriffsbestimmung, Wirkungsweise und rechtlicher Rahmen	4
2.2 Aufwandmengen	8
2.3 Untersuchungen zur Persistenz von Tierarzneimitteln in Masthähnchenfestmist und anderen Wirtschaftsdüngern	11
2.4 Untersuchungen zur Mobilität von Tierarzneimitteln in Böden	15
3 Teilvorhaben 1: Modellversuche zur Persistenz von Tetrazyklin in Geflügelfestmist und Nachweis ausgewählter Tierarzneimittel in Schweinegülleproben	20
3.1 Entwicklung einer Nachweismethode für Tetrazyklin-HCL in Masthähnchenfestmist mittels HPLC	20
3.2 Ausscheidung von oral verabreichtem Tetrazyklin durch Masthähnchen	23
3.2.1 Versuchsaufbau	23
3.2.2 Ergebnisse	25
3.3 Persistenz von Tetrazyklin in Masthähnchenfestmist.....	29
3.3.1 Versuchsaufbau	29
3.3.2 Ergebnisse	32
3.4 Screening: Nachweis ausgewählter Tierarzneimittel in Schweinegülleproben.....	39
3.4.1 Erweiterung der Nachweismethode für Tetrazykline und ausgewählte Sulfonamide	39
3.4.2 Ergebnisse	42
3.4.2.1 Screening anonymer Schweinegülleproben.....	42
3.4.2.2 Wirkstoffnachweis in Schweinegülle nach bekanntem Tierarzneimittelleinsatz	44
4 Teilvorhaben 2: Modellversuche zur Mobilität von Tetrazyklin und Sulfadiazin in Böden	47
4.1 Modifikation der HPLC-Nachweismethode für Tetrazykline in Sickerwasser	47
4.1.1 Tetrazykline	47
4.1.2 Sulfadiazin.....	49

4.2	Mobilität von Tetrazyklin und Sulfadiazin in verschiedenen Böden im Krumenlysimeter	51
4.2.1	Versuchsaufbau	51
4.2.2	Ergebnisse	55
4.2.2.1	Starkregensimulation 48 h nach Versuchsansatz	55
4.2.2.2	Starkregensimulation nach 10 Wochen	59
4.3	Mobilität von Tetrazyklin und Sulfadiazin im Lysimeter	61
4.3.1	Versuchsaufbau	61
4.3.2	Ergebnisse	65
4.3.2.1	Tetrazyklin	65
4.3.2.2	Sulfadiazin	72
5	Teilvorhaben 3: Antibiotikaresistenz in Böden: Modellversuche zur Etablierung, Verbreitung und Persistenz	74
5.1	Experimenteller Ansatz	74
5.2	Nachweis und Quantifizierung von Tetrazyklin-Resistenzgenen.....	77
5.2.1	Nachweis von Tetrazyklin-Resistenzgenen.....	78
5.2.1.1	Methodik	78
5.2.1.2	Ergebnisse und Auswertung	80
5.2.2	Quantifizierung der Tetrazyklin-Resistenzgene	86
5.2.2.1	Methodik	86
5.2.2.2	Ergebnisse und Auswertung	87
5.3	Struktur bakterieller Bodengemeinschaften	87
5.3.1	Methodik.....	88
5.3.2	Ergebnisse und Auswertung	89
5.4	Bodenmikrobielle Aktivität	94
5.4.1	Methodik.....	95
5.4.2	Ergebnisse und Auswertung	97
6	Zusammenfassende Diskussion und Bewertung der Ergebnisse.....	107
7	Schlussfolgerungen	122
8	Ausblick	123
9	Literaturverzeichnis	126
10	Anhang.....	132

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: EU-weiter Antibiotika-Einsatz einschließlich Humanmedizin (inkl. Schweiz) in den Jahren 1997 und 1999 (FEDESA 2001)	9
Tabelle 2: Antibiotika-Verbrauch in der Veterinärmedizin in der EU (FEDESA 1999)	10
Tabelle 3: Löslichkeit (S), n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (K_{ow}) und Adsorptionskoeffizienten an die Bodenmatrix (K_f) sowie an die organische Substanz (K_{oc}) und an Kationen von ausgewählten Tierarzneimittelwirkstoffen (Tolls 2001; Rabølle und Spliid 2000; Höper et al. 2002)	16
Tabelle 4: Wiederfindung (%) von Tetrazyklin einschl. 4-Epi-Tetrazyklin in Masthähnchenfestmist	22
Tabelle 5: Übersicht zu Versuchsanordnung und -bedingungen bei der Untersuchung der Persistenz von Tetrazyklin in Masthähnchenfestmist	31
Tabelle 6: Kenngrößen des im Lagerungsversuch eingesetzten Geflügelfestmistes zu Beginn der Lagerung (bezogen auf Trockensubstanz (%))	33
Tabelle 7: Wiederfindungsraten (%) für Tetrazyklin, Chlortetrazyklin und Oxytetrazyklin einschließlich der Epimere in Gülle bei externer Kalibration	41
Tabelle 8: Wiederfindung (%) der Sulfonamide einschließlich der Epimere in Gülle bei externer Kalibration	41
Tabelle 9: Verteilung der Gülleproben in Bezug auf den Trockensubstanzgehalt	43
Tabelle 10: Nachweis ausgewählter Tierarzneimittel in von der LWK S-H zur Verfügung gestellten Gülleproben	45
Tabelle 11: Wiederfindung (%) der Tetrazykline einschließlich der Epimere in Sickerwasser bei interner Kalibration	49
Tabelle 12: Wiederfindung (%) von Sulfadiazin in Sickerwasser bei interner Kalibration	51
Tabelle 13: Kenndaten der verwendeten Böden im Gefäßversuch	52
Tabelle 14: Versuchsübersicht zur Mobilität von Tetrazyklin und Sulfadiazin in den Gefäßen (V = Variante; TC = Tetrazyklin; SD = Sulfadiazin)	54
Tabelle 15: Gehalte an Tetrazyklin und Sulfadiazin ($\mu\text{g/kg}$) im Sickerwasser bei Beregnung nach 48h (V1 = humoser Sandboden; V2 = lehmiger Schluff; V3 = Nullerde; I-IV = Fraktionen)	56

Tabelle 16: Kenndaten der in den Lysimetern verwendeten Böden, Krume – Unterboden	62
Tabelle 17: Übersicht zur Versuchsanordnung bei der Untersuchung der Mobilität von Tetrazyklin und Sulfadiazin im Lysimeter (TC = Tetrazyklin; SD = Sulfadiazin)	64
Tabelle 18: Tetrazyklin-Gehalte ($\mu\text{g/l}$) im Sickerwasser unter Mais, 2001 (I: humoser Sandboden I; II: humoser Sandboden II)	66
Tabelle 19: Bodenkenndaten der in den Versuchen eingesetzten Böden. B = Borstel; GF = Grönheimer Feld; D = Dinklage; U = Uesen	75
Tabelle 20: Qualitativer Nachweis der Tetrazyklin-Resistenzgene (Tet A, B, D, E, M, O, Q, S, T, W) im Vorversuch 1 mit Boden vom Grönheimer Feld (GF)	81
Tabelle 21: Qualitativer Nachweis der Tetrazyklin-Resistenzgene im Vorversuch 2 mit Boden vom Grönheimer Feld (GF) bzw. Borstel (B)	82
Tabelle 22: Qualitativer Nachweis der Tetrazyklin-Resistenzgene im Hauptversuch mit Boden aus Dinklage (D) und Uesen (U)	85
Tabelle 23: Anzahl aller terminaler Restriktionsfragmente pro T-RFLP Muster für die Versuche mit Boden aus Grönheimer Feld, Dinklage und Uesen	94
Tabelle 24: Vorversuch 1. Atmungsaktivität ($\text{mg O}_2 \cdot 100\text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) in Grönheimer Feld Boden (GF) in Abhängigkeit zur Tetrazyklinkonzentration	97
Tabelle 25: Vorversuch 1. Potentielle Ammoniumoxidation ($\text{ng NO}_2\text{-N} \cdot \text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) in Grönheimer Feld Boden (GF) in Abhängigkeit zur Tetrazyklinkonzentration	98
Tabelle 26: Vorversuch 2. Basalatmung ($\text{mg O}_2 \cdot 100\text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) in Grönheimer Feld (GF) und Borstel Boden (B) in Abhängigkeit zur Tetrazyklinkonzentration und der Rinderdungapplikation	99
Tabelle 27: Vorversuch 2. Substratinduzierte Atmung ($\text{mg O}_2 \cdot 100\text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) in Grönheimer Feld (GF) und Borstel Boden (B) in Abhängigkeit zur Tetrazyklinkonzentration und der Rinderdungapplikation	100
Tabelle 28: Vorversuch 2. Potentielle Ammoniumoxidation ($\text{ng NO}_2\text{-N} \cdot \text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) in Grönheimer Feld (GF) und Borstel Boden (B) in Abhängigkeit zur TC-Konzentration und der Rinderdungapplikation	102
Tabelle 29: Hauptversuch. Substratinduzierte Atmung ($\text{mg O}_2 \cdot 100\text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) in Dinklage (D) und Uesen Boden (U) in Abhängigkeit zur Tetrazyklinkonzentration	104

Tabelle 30: Hauptversuch. Potentielle Ammoniumoxidation ($\text{ng NO}_2\text{-N} \cdot \text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) in Dinklage (D) und Uesen Boden (U) in Abhängigkeit zur Tetrazyklinkonzentration	105
Tabelle 31: Tetrazyklin-Konzentration im Hühnerkot (mg TC/kg Kot) der Varianten 1, 3, 4 und 6 bei 10-tägiger TC-Applikation (Tag 1 bis Tag 12), bezogen auf TS (%)	132
Tabelle 32: Tetrazyklin-Konzentrationen im Masthähnchenfestmist (mg TC/kg Kot) der Varianten 1, 3, 4 und 6 während der 3-monatigen Kompostierung, bezogen auf TS (%) und C (%)	133
Tabelle 33: Ermittelte Wirkstoffkonzentrationen (TC, OTC, CTC, SD, SM) des Screening der Schweinegülleproben aus dem Winter 2001/2002, n=176	134
Tabelle 34: Tetrazyklin-Gehalte im Boden der Kick-Brauckmann-Gefäße, 48 h bzw. 10 Wochen nach Starkregenereignis	139
Tabelle 35: Sulfadiazin-Gehalte im Boden der Kick-Brauckmann-Gefäße, 48 h bzw. 10 Wochen nach Starkregenereignis	140
Tabelle 36: Verlauf der Tetrazyklin-Gehalte im Boden ausgewählter Lysimeter während der Versuchsdauer (TC-Gabe über Gülle im Mai 2001 (Roggen früher, Mais später) und Mai 2002; Lys. 4+28 = 45,0 bzw. 44,3 mg TC; Lys. 13, 15, 33, 35 = 67,2 bzw. 66,5 mg TC)	141
Tabelle 37: Verlauf der Sulfadiazin-Gehalte im Boden ausgewählter Lysimeter während der Versuchsdauer (SD-Gabe über Gülle im Mai 2002, Lys. 4+28 = 44,3 mg SD; Lys. 13, 15, 33, 35 = 66,5 mg SD)	141
Tabelle 38: Verlauf der Chlortetrazyklin-Gehalte im Boden ausgewählter Lysimeter während der Versuchsdauer (Nebenbefund)	142

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundstruktur der Tetrazykline	6
Abbildung 2: Grundstruktur der Sulfonamide	7
Abbildung 3: Masthähnchen-Eintagsküken im Abteil kurz nach der Einstellung	24
Abbildung 4: Verlauf der Gesamt-TC-Konzentration einschließlich 4-Epi-Tetrazyklin (mg/kg) in den frischen Ausscheidungen der Gruppe A (Tiere der Gruppen V1 und V3; 0,5 g TC/kg Futter)	26
Abbildung 5: Verlauf der Gesamt-TC-Konzentration (mg/kg) einschließlich 4-Epi-Tetrazyklin in den frischen Ausscheidungen der Variante B (Tiere der Gruppen V4 und V6; 1,0 g TC/kg Futter)	27
Abbildung 6: Verlauf der mittleren Gesamt-TC-Konzentration (mg/kg) einschließlich 4-Epi-Tetrazyklin in den frischen Ausscheidungen der Varianten A und B im Vergleich	28
Abbildung 7: Masthähnchenfestmist in den Kompostbehältern	30
Abbildung 8: Durchmischter Festmist beim Umsetzen der aeroben Lagerungsvariante	30
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung beim Lagerversuch	31
Abbildung 10: Mittlerer Temperaturverlauf der aeroben und anaeroben Varianten während der 3-monatigen Lagerung	34
Abbildung 11: Mittlerer Temperaturverlauf der Varianten mit unterschiedlicher TC-Dosis (Variante A: 0,5 g TC/kg Futter; Variante B: 1,0 g TC/kg Futter; Variante C: Kontrolle)	35
Abbildung 12: Verlauf der Konzentration an Tetrazyklin (mg/kg) im Masthähnchenfestmist der Variante A (0,5 g TC/kg Futter; Tiere V1 und V3) über die dreimonatige Lagerung, bezogen auf die Trockensubstanz (%)	36
Abbildung 13: Mittlerer Verlauf der Konzentration an Tetrazyklin (mg/kg) im Masthähnchenfestmist der Variante A (0,5 g TC/kg Futter, Tiere V1 und V3) über die dreimonatige Lagerung, bezogen auf Trockensubstanz (%) sowie Kohlenstoff (%)	37
Abbildung 14: Verlauf der Konzentration an Tetrazyklin (mg/kg) im Masthähnchenfestmist der Variante B (1,0 g TC/kg Futter; Tiere V4 und V6) über die dreimonatige Lagerung, bezogen auf die Trockensubstanz (%)	38

Abbildung 15: Mittlerer Verlauf der Konzentration an Tetrazyklin (mg/kg) im Masthähnchenfestmist der Variante B (1,0 g TC/kg Futter, Tiere V4 und V6) über die dreimonatige Lagerung, bezogen auf Trockensubstanz (%) sowie Kohlenstoff (%)	38
Abbildung 16: Befüllte Gefäße vor der Beaufschlagung mit Gülle	52
Abbildung 17: Fraktionierte Beprobung des Sickerwassers	55
Abbildung 18: TC-Konzentration in den Sickerwasserfraktionen I bis IV der Varianten V3 (Nullerde/Torf), Starkregenereignis 48 h nach Begüllung	57
Abbildung 19: TC-Konzentration im Ober- und Unterboden der Versuchsböden V1, V2 und V3; Starkregenereignis nach 48h	58
Abbildung 20: SD-Konzentration im Oberboden der Versuchsböden V1, V2 und V3; Starkregenereignis nach 48h	59
Abbildung 21: TC-Konzentration im Ober- und Unterboden der Versuchsböden V1, V2 und V3; Starkregenereignis nach 10 Wochen	60
Abbildung 22: SD-Konzentration im Oberboden der Versuchsböden V1, V2 und V3; Starkregenereignis nach 10 Wochen	60
Abbildung 23: Mit Winterroggen bestellte Lysimeter	63
Abbildung 24: Sickerwasseranfall unter Lysimeter 2 (humoser Sand I), Mais, Durchgang 2001; TC-Befund 19. KW	67
Abbildung 25: Sickerwasseranfall unter Lysimeter 13 (humoser Sand I), Mais, Durchgang 2001, TC-Befund 22. KW	67
Abbildung 26: Sickerwasseranfall unter Lysimeter 58 (humoser Sand II), Mais, Durchgang 2001, TC-Befund 21. KW	68
Abbildung 27: Sickerwasseranfall unter Lysimeter 65 (humoser Sand II), Mais, Durchgang 2001, TC-Befund 21. KW	68
Abbildung 28: Verlauf der TC-Gesamt-Konzentration im Boden bei ausgewählten Lysimetern, Fruchtart Roggen, Zeitraum Frühjahr 2001 bis Herbst 2002 (Lys. 15 + 33 = 67,2 mg TC (2001)/ 66,5 mg TC (2002))	69
Abbildung 29: Verlauf der TC-Gesamt-Konzentration im Boden bei ausgewählten Lysimetern, Fruchtart Mais, Zeitraum Herbst 2001 bis Herbst 2002 (Lys. 4 + 28 = 45,0 mg TC (2001)/ 44,3 mg TC (2002); Lys. 13 + 35 = 67,2 mg TC (2001)/ 66,5 mg TC (2002))	71
Abbildung 30: Verlauf der SD-Konzentration im Boden bei ausgewählten Lysimetern, Fruchtart Mais, Zeitraum Frühjahr 2002 bis Herbst 2002 (Lys. 4 + 28 = 44,3 mg SD; Lys. 13 + 35 = 66,5 mg SD)	72

Abbildung 31: Verlauf der SD-Konzentration im Boden bei ausgewählten Lysimetern, Fruchtart Roggen, Zeitraum Frühjahr 2002 bis Herbst 2002 (Lys. 15 + 33 = 66,5 mg SD)	73
Abbildung 32: T-RFLP Muster der Struktur der bakteriellen Lebensgemeinschaft im Boden Grönheimer Feld zu Beginn der Inkubationsversuche (a) und nach 56 Tagen (b)	90
Abbildung 33: T-RFLP Muster der Struktur der bakteriellen Lebensgemeinschaft im Boden Dinklage zu Beginn der Inkubationsversuche (a) und nach 56 Tagen (b)	91
Abbildung 34: T-RFLP Muster der Struktur der bakteriellen Lebensgemeinschaft im Boden Uesen zu Beginn der Inkubationsversuche (a) und nach 56 Tagen (b)	92
Abbildung 35: Anzahl aller Fragmente pro T-RFLP-Muster für die Versuche mit Boden aus Grönheimer Feld, Dinklage und Uesen	93
Abbildung 36: Hauptversuch. Substratinduzierte Atmung ($\text{mg O}_2 \cdot 100\text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) in Dinklage (D) und Uesen Boden (U) in Abhängigkeit zur Tetrazyklinkonzentration	104
Abbildung 37: Hauptversuch. Potentielle Ammoniumoxidation ($\text{mg NO}_2\text{-N} \cdot 100\text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) in Dinklage (D) und Uesen Boden (U) in Abhängigkeit zur Tetrazyklinkonzentration	106

Glossar

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
Al	Aluminium
AMG	Arzneimittelgesetz
ASS	Acetylsalicylsäure
BfT	Bundesverband für Tiergesundheit
BGBI	Bundesgesetzblatt
Bp	Basenpaare
BSB	Biologischer Sauerstoffbedarf
C	Kohlenstoff
C_{mik}	Mikrobieller Kohlenstoff
C_{org}	Organischer Kohlenstoff
CTC	Chlortetrazyklin
CVMP	Committee for Veterinary Medicinal Products
dest.	Destilliert
EMA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
Epi-TC	Epi-Tetrazyklin
et al.	et alii (und andere)
EU	Europäische Union
EUR	EURO
Fa.	Firma
Fe	Eisen
FEDESA	European Federation of Animal Health Industry
ha	Hektar
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
k. A.	keine Angabe
K_2O	Kaliumoxid
KAK	Kationenaustauschkapazität
$K_{\text{d, DOM}}$	Adsorptionskoeffizient, bezogen auf gelöste organische Substanz (dissolved organic matter)
K_{D} -Wert	Boden-Sorptionskonstante
K_{f}	Bodenadsorptionskoeffizient, bezogen auf die Bodenmatrix
K_{oc}	Bodenadsorptionskoeffizient, bezogen auf die organische Substanz im Boden
K_{ow}	n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
KW	Kalenderwoche
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spektrometry

XIII

LUFA	Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt
M	Mol
Mg	Magnesium
mval	Milliäquivalent
n	Anzahl
N	Stickstoff
nm	Nanometer
Ø	Durchmesser, Durchschnitt
OS	Organische Substanz
OTC	Oxytetracyclin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEC	Predicted Environmental Concentration
PLFA-Analyse	Phospholipidfettsäure-Analyse
Pk _a -Wert	Dissoziationskonstante
ppb	parts per billion
S	Löslichkeit
SA	Sulfonamide
SD	Sulfadiazin
SIR	Substratinduzierte Respiration
SI	lehmiger Sand
SM	Sulfamethazin
Ss	Sand
STD	Standardabweichung (standard deviation)
Su2	schwach schluffiger Sand
Su3	mittel schluffiger Sand
SW	Sickerwasser
TC	Tetracyclin
Tet	Tetracyclinresistenzgene
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (Terminaler Restriktionsfragment Längenpolymorphismus)
TS	Trockensubstanz
U	Umdrehung
UVP	Umweltverträglichkeitsprüfung
WHK _{max}	Maximale Wasserhaltekapazität

1 Einführung in die Problemstellung und Vorgehensweise

Arzneimittelwirkstoffe werden in der Nutztierhaltung in nennenswertem Umfang eingesetzt. Es handelt sich dabei in erster Linie um Antibiotika, die in zum Teil aktiver Form durch den tierischen Organismus ausgeschieden werden. Über Wirtschaftsdünger wie Gülle oder Festmist können diese Stoffe in Böden eingetragen werden. Bei den angewandten Antibiotika handelt es sich hauptsächlich um so genannte Altpräparate, für die zum Zeitpunkt der Zulassung keine Umweltverträglichkeitsprüfung gefordert war. Über das Umweltverhalten dieser Wirkstoffe ist somit bisher wenig bekannt. Wichtige Kriterien für eine Risikobewertung hinsichtlich Bodenschutz sind (1) verlässliche Angaben zu Expositionsabschätzung, (2) zu potentiellen Austrägen ins Grundwasser, (3) zur biologischen Abbaubarkeit oder (4) zu den Auswirkungen auf die mikrobielle Bodenbiozönose. Einen weiteren wichtigen Aspekt stellt die mögliche Induktion und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen im Boden und anderen Ökosystemen dar.

Für ein effektives Risikomanagement ist es daher erforderlich, die oben genannten Wissenslücken zu schließen, um damit zu einer verbesserten Risikoeinschätzung für Umwelt und Gesundheit zu gelangen.

Ausgehend von einer früheren Studie, die eine ausgeprägte Persistenz von Tetrazyklin in Schweinegülle aufzeigte (UFOPLAN 297 33 911), hatte das vorliegende Forschungsvorhaben zum Ziel, die Ausscheidung von Tetrazyklin bei Mastgeflügel und dessen Persistenz in Festmist zu untersuchen sowie die Gehalte an ausgewählten Tetrazyklinen und Sulfonamiden (als quantitativ zweitwichtigste Substanzgruppe) von Gülleproben in der Praxis zu erfassen (Teilvorhaben 1).

Die Mobilität von Tetrazyklin und Sulfadiazin in verschiedenen Böden nach Ausbringung über Gülle war Gegenstand des zweiten Teilvorhabens.

Teilvorhaben 3 beschäftigte sich mit Modellversuchen zur Etablierung, Verbreitung und Persistenz von Tetrazyklinresistenzen im Boden.

Teilvorhaben 1 und 2 wurden vom Forschungs- und Studienzentrum für Veredelungswirtschaft Weser-Ems in Vechta (FOSVWE) in Zusammenarbeit mit der Landwirtschaftskammer Weser-Ems in Oldenburg bearbeitet, Teilvorhaben 3 lag in der Verantwortung des Fraunhofer-Instituts für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie in Schmallenberg.

Zunächst erfolgte eine Sichtung des aktuellen Wissensstandes auf der Grundlage internationaler Literaturliteraturdatenbanken (Current Contents, Biological Abstracts, Soil etc.) hinsichtlich Pharmakologie, Umweltverhalten, Antibiotikaresistenz in Böden und Nachweisverfahren in verschiedenen Matrices für die o. g. Leitsubstanzen; den Bereichen Boden, Wasser und Mastgeflügel kam dabei besondere Beachtung zu..

Auf der Grundlage dieser Erhebung erfolgte die Anpassung HPLC-basierter Nachweisverfahren für Tetrazykline in Masthähnchenfestmist und Sickerwasser bzw. Sulfonamide in Sickerwasser und Gülle.

Die experimentellen Arbeiten umfassten folgende Teilaspekte:

- Ausscheidungsverlauf von oral in praxisüblichen Dosierungen über das Futter verabreichtem Tetrazyklin bei Masthähnchen
- Persistenz des Wirkstoffs Tetrazyklin in Masthähnchenfestmist bei unterschiedlichen Lagerbedingungen (unter Verwendung des aus dem Fütterungsversuch angefallenen Festmists)
- Mobilität von Tetrazyklin und Sulfadiazin im Boden; zu dieser Problematik wurden Lysimeter- und Gefäßversuche mit unterschiedlichen Böden bzw. Substraten durchgeführt
- anonymes Screening auf Tetrazyklin- und Sulfonamidrückstände in Schweinegülle ohne und mit bekanntem Wirkstoffeinsatz

- Etablierung, Verbreitung und Stabilität einer spezifischen Tetrazyklinresistenz in Böden unter Anwendung der PCR-Methode (Polymerase Chain Reaction) und der T-RFLP-Analyse (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)
- Einfluss von Tetrazyklin auf die bakterielle Lebensgemeinschaft sowie die bodenmikrobielle Aktivität (PCR, Messung der Bodenatmung und der potentiellen Nitrifikationsleistung)

2 Stand des Wissens

2.1 Begriffsbestimmung, Wirkungsweise und rechtlicher Rahmen

Tierarzneimittel sind Medikamente, die in der Veterinärmedizin in therapeutisch notwendiger Dosierung verabreicht werden und verschreibungspflichtig durch den Tierarzt sind. Sie unterliegen dem Arzneimittelgesetz. Im Gegensatz dazu wird die Zulassung pharmakologisch wirksamer Futterzusatzstoffe, die in subtherapeutischen Dosierungen verfüttert werden, um leistungssteigernde Effekte wie z.B. erhöhte Mastleistung beim Tier zu erzielen, durch das Futtermittelgesetz geregelt. Antimikrobiell wirksame Substanzen finden sich sowohl bei Tierarzneimitteln als auch unter den Futterzusatzstoffen. Allerdings werden als Futtermittelzusatzstoffe keine Antibiotika verwendet, die auch in der Humanmedizin oder als Tierarzneimittel zugelassen sind.

Als pharmakologisch wirksame Futterzusatzstoffe sind derzeit noch in der EU zugelassen (Stand Frühjahr 2003):

- Avilamycin
- Flavophospholipol
- Monensin-Natrium
- Salinomycin-Natrium

Da der Einsatz dieser Substanzen in den vergangenen Jahren aufgrund potenzieller Kreuzresistenzen zunehmend kritisch betrachtet wurde, hat die EU im Frühjahr 2002 ein Verbot der 4 noch zugelassenen antimikrobiell wirkenden Futtermittelzusatzstoffe ab 2006 vorgeschlagen (KOM 2002). Im Entwurf zur diesbezüglichen Verordnung wurde festgelegt, dass Zusatzstoffe grundsätzlich nur noch für 10 Jahre zugelassen werden; nach Ablauf dieses Zeitraums muss jeweils eine Neuzulassung beantragt werden. Firmen, die bereits nach geltenden Vorschriften zugelassene Futtermittelzusatzstoffe in Verkehr bringen, müssen innerhalb der nächsten sieben Jahre eine Neubewertung und

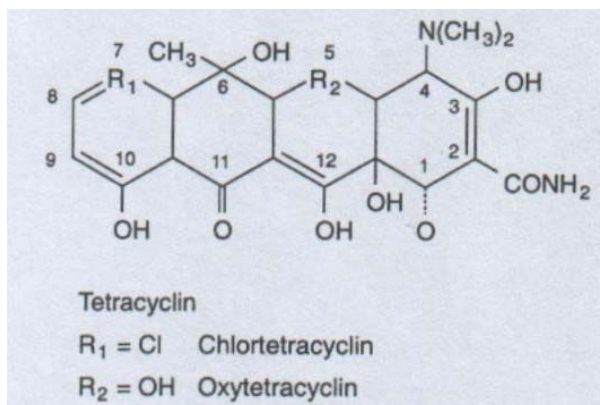
Neuzulassung ihrer Produkte beantragen. Dazu müssen die Unternehmen nachweisen, dass der Zusatzstoff positive Wirkungen auf das Tier hat und dass für die Gesundheit von Mensch und Tier sowie für die Umwelt keine Gefahr besteht.

Die in diesem Forschungsvorhaben näher untersuchten Tetrazykline gehören zu den Tierarzneimitteln und hier zur Gruppe der Antibiotika, für die auch häufig der Begriff Antiinfektiva verwendet wird (Kroker et al. 1996). Sie werden als Arzneimittel sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin eingesetzt. Der Begriff Antibiotika leitet sich aus der Entstehung derselben in verschiedenen Mikroorganismen wie Bakterien oder Pilzen ab (Kroker et al. 1996). Unter dem Oberbegriff Chemotherapeutika werden sowohl die natürlichen als auch die synthetisch hergestellten Antibiotika mit vergleichbarer Wirkung zusammengefasst. Antibiotika werden hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Bakterienwachstum als bakterizid bzw. bakteriostatisch bezeichnet. Die erfolgreiche Wirkung gegen Bakterien ist von der Konzentration der antibakteriell wirkenden Substanz am Infektionsort abhängig. Sie muß hoch genug sein, um eine bakterizide oder bakteriostatische Wirkung erzielen zu können. Die Anwendung bakteriostatisch wirkender Antibiotika setzt ein funktionstüchtiges Abwehrsystem im zu behandelnden Organismus voraus, da der Beginn der klinischen Wirksamkeit sich erst nach 2 bis 3 Tagen Behandlungsdauer erkennen läßt. Bei bakterizid wirkenden Antibiotika tritt ein sofortiger Zelltod des zu bekämpfenden Keimes ein, eine Wirksamkeit ist in diesem Fall nach 1 bis 2 Tagen zu beobachten (Kroker et al. 1996).

Tetrazykline (Abb. 1) zählen zu den Breitband-Antibiotika und wirken bakteriostatisch gegen grampositive und -negative Bakterien. Sie werden von Streptomycesarten gewonnen. Indikationsgebiete sind Infektionen der Atemwege, des Urogenital- und des Magen-Darm-Traktes sowie der Haut (Kroker et al. 1996). Die verschiedenen Wirkstoffe innerhalb der Tetrazyklingruppe wie z.B. Chlor- oder Oxytetrazyklin unterscheiden sich

lediglich durch kleine Veränderungen an der Molekülstruktur. Tetrazykline zeigen eine hohe Affinität zu polyvalenten Kationen unter der Bildung von Chelatverbindungen. Aus diesem Grund ist die orale Bioverfügbarkeit stark abhängig vom Füllungszustand des Magens und der Zusammensetzung der verabreichten Nahrung. Tetrazykline werden je nach Tierart zu veränderlichen Anteilen in aktiver Form renal durch globuläre Filtration oder via Faeces ausgeschieden. Bei feuchter Lagerung, Lichteinwirkung und hohen Temperaturen bilden sich über Dehydratationen Epi-, Epianhydro- oder Anhydroprodukte (Kühne et al. 2001; Kroker et al. 1996; Kroker 1997).

Neben den Tetrazyklinen gibt es noch weitere wichtige Antibiotikagruppen. Hier sind u.a. die Sulfonamide, Aminoglykoside, β -Laktame, Polymyxine, Chinolone, Makrolide und Lincosamide zu nennen. Im vorliegenden Forschungsvorhaben wurden neben den Tetrazyklinen auch Sulfonamide berücksichtigt, um ein weiteres häufig eingesetztes Tierarzneimittel in die Untersuchungen zur Persistenz und Mobilität mit einzubeziehen.



Molgewichte:

Tetrazyklin 444,43

Chlortetrazyklin 515,30

Oxytetrazyklin 496,90

Abbildung 1: Grundstruktur der Tetrazykline (R = Rest) (Kroker et al. 1996)

Molgewichte:

Sulfadiazin 250,28

Sulfamethazin 278,32

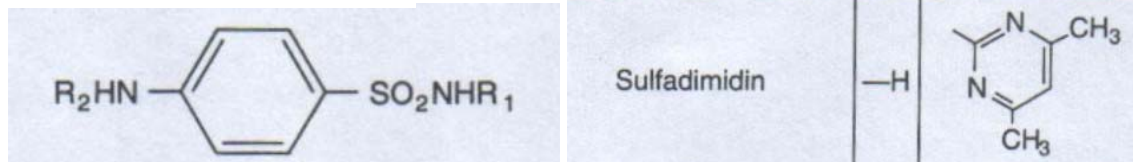


Abbildung 2: Grundstruktur der Sulfonamide (R = Rest) (Kroker et al.1996)

Sulfonamide stellen Derivate des p-Amino-Benzoe-Sulfonamids (Sulfanilamid) dar (Abb. 2). Sie bestehen aus einem Benzolkern mit einer Amino- und einer Sulfonamidgruppe (Kroker et al. 1996). Sulfonamide besitzen wie die Tetrazykline ein sehr weites Wirkungsspektrum und sind als Breitband-Antibiotika anzusehen. In der praktischen Therapie werden Sulfonamide häufig in verschiedenen Kombinationen angewendet. Hier hat sich vor allem der synergistische Effekt von Trimethoprim bewährt, einem Antimetaboliten, der die bakterielle Folsäuresynthese bei zwei aufeinander folgenden Schritten hemmt. Die Dosishöhe der Einzelkomponenten lässt sich durch diesen synergistischen Effekt senken.

Im Stoffwechsel des Warmblüterorganismus kommen Sulfonamide in drei Hauptformen vor: als freies sowie als an Plasmaproteine gebundenes Sulfonamid und als acetylierte Verbindung, welche das Hauptabbauprodukt bildet (Kroker et al. 1996). Der an Proteine gebundene Teil kann nicht antibakteriell wirken. Wirksam ist nur das freie, nicht acetylierte Sulfonamid. Die Ausscheidung erfolgt hauptsächlich durch die Niere. Wie auch bei den Tetrazyklinen werden die Sulfonamide größtenteils in unveränderter, also chemotherapeutisch aktiver Form ausgeschieden. Ein Teil der Sulfonamide wird als unwirksame Metaboliten, vor allem Acetylderivate, Glucuronide und Konjugate mit Schwefelsäure, über den Harn abgegeben (Kroker et al. 1996).

Beide Wirkstoffgruppen, sowohl die Tetrazykline als auch die Sulfonamide, werden als so genannte Altpräparate bezeichnet. Mit dem Begriff Altpräparate werden Tierarzneimittel umschrieben, die vor dem 01.01.1978 zur Anwendung gekommen sind oder zwischen 1978 und 1998 zugelassen wurden (Winckler und Grafe 2000). Vor 1998 unterlagen die Wirkstoffe keiner Umweltverträglichkeitsprüfung und auch bei Nachzulassungsverfahren wurde vor 1998 keine UVP gefordert. Mit Wirkung zum 01.01.1998 ist eine vom Ausschuss für Tierarzneimittel (CVMP, Committee for Veterinary Medicinal Products) der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA, European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) erarbeitete Leitlinie (EMA/CVMP-055/96) zur Durchführung einer Umweltverträglichkeitsprüfung von neu zuzulassenden Tierarzneimitteln EU-weit in Kraft getreten. Eine Überarbeitung erfolgte im Jahr 2000 (EMA/CVMP/VICH/592/98; VICH GL 6 –Ecotoxicity Phase I) (EMA 2000). Unter Berücksichtigung der eingesetzten Menge des Wirkstoffes, der biologischen Abbaubarkeit, der Adsorption im Boden und anderer Parameter wird im ersten Schritt ein Expositionsszenario erstellt und die zu erwartende Konzentration im Boden (predicted environmental concentration PEC_{soil}) ermittelt (Phase I). Bei der Überschreitung bestimmter Schwellen- bzw. Triggerwerte ($PEC_{soil} > 100 \mu\text{g/kg}$; $PEC_{water} > 1 \mu\text{g/l}$) sind weitere Untersuchungen zur Ökotoxizität, zum Abbau im Boden bzw. Wasser sowie zur Adsorption erforderlich (Phase II). Da sich die Leitlinie nur auf die Zulassung neuer Tierarzneimittel bezieht, werden Altpräparate diesbezüglich nicht untersucht. Auf die Bewertungslücke hinsichtlich Umweltrelevanz dieser Wirkstoffe wurde bereits an verschiedener Stelle hingewiesen (Winckler und Grafe 2000; Montforts et al. 1999; Hamscher et al. 2002; Höper et al. 2002; Tolls 2001).

2.2 Aufwandsmengen

In der Veterinärmedizin stellt der Einsatz von Antibiotika bzw. Antiinfektiva in Deutschland ca. 30 % des Gesamtumsatzes von Tierarzneimitteln dar (2001:

Gesamtumsatz Tierarzneimittel 481 Mio EUR; davon Antiinfektiva: EUR 132 Mio.; 3,4 % Zuwachs gegenüber 2000) (BfT 2002). Eine detaillierte Auflistung des Gesamtverbrauches an Tierarzneimitteln z. B. hinsichtlich einzelner Wirkstoffe und Tierarten bzw. Nutzungsrichtungen ist weder EU- noch deutschlandweit verfügbar. Zwar wird in Deutschland die Abgabe von Tierarzneimitteln durch die Tierärzte registriert, aber es besteht keine zentrale Erfassung der Daten. Im September 2001 wurde die Verordnung über Nachweispflichten für Arzneimittel erweitert und ein Bestandsbuch eingeführt, in welches Tierhalter und Tierarzt alle Medikamentenanwendungen eintragen (BGBl. I vom 21. August 2001, S. 2131). Eine regelmäßige Auswertung dieser Aufzeichnungen ist jedoch bisher gesetzlich nicht vorgeschrieben.

Lediglich vom europäischen Industrieverband FEDESA (European Federation of Animal Health Industry) liegen Verbrauchszahlen für die EU vor (Tab. 1).

Tabelle 1: EU-weiter Antibiotika-Einsatz einschließlich Humanmedizin (inkl. Schweiz) in den Jahren 1997 und 1999 (FEDESA 2001)

Antibiotika-Einsatz über:	1999		1997	
	(t)	(%)	(t)	(%)
Tierarzneimittel	3.902	29	3.494	27
Leistungsförderer in der Tierhaltung	786	6	1.599	13
Humanarzneimittel	8.528	65	7.659	60
Gesamt	13.216	100	12.752	100

Aus den FEDESA-Angaben wird deutlich, dass sich im Bereich der antibiotisch wirksamen Tierarzneimittel ein Anstieg von 11 % im Zeitraum von 1997 bis 1999 ergeben hat, bei den Humanarzneimitteln ist eine ähnliche Steigerung zu verzeichnen. Demgegenüber war für die Futtermittelzusatzstoffe ein Rückgang von 50 % zu verzeichnen. Letztere Entwicklung ist auf die Zulassungs-Rücknahme durch die EU für einige Leistungsförderer seit dem Jahr 1997 zurückzuführen (Avoparcin, Virginiamycin, Zink-Bacitracin, Spiramycin,

Tylosinphosphat, Carbadox, Olaquinox). Durch das geplante Verbot der zurzeit noch zugelassenen antibiotisch wirksamen Futterzusatzstoffe ab 2006 (s. Kap. 2.1) wird der Einsatz in Zukunft vermutlich keine Rolle mehr spielen.

Die insgesamt in Deutschland eingesetzte Antibiotikamenge verteilt sich zu zwei Dritteln auf die Humanmedizin und zu einem Drittel auf den veterinärmedizinischen Bereich.

Bezüglich der eingesetzten Tierarzneimittel stellte sich die Aufteilung nach Wirkstoffgruppen im Jahr 1999 wie folgt dar (Tab. 2):

Tabelle 2: Antibiotika-Verbrauch in der Veterinärmedizin in der EU (FEDESA 1999)

Produktgruppe	Anteil in %
Penicilline	9
Tetrazykline	66
Makrolide	12
Aminoglykoside	4
Fluorchinolone	1
Trimethoprim/Sulfonamide	2
Sonstige	6

Tetrazykline stellen in der EU mit Abstand die am häufigsten eingesetzten Wirkstoffe dar. Auch eine auf das Weser-Ems-Gebiet begrenzte Erhebung zum Tierarzneimittelaufwand für das Jahr 1997 (Winckler und Grafe 2000) kam zu dem Ergebnis, dass die Gruppe der Tetrazykline von den über die tierärztlichen Herstellungsaufträge verschriebenen Antibiotika den größten Anteil ausmachten (> 59 %). Ihr Einsatz fand vornehmlich in der Schweinemast statt (ca. 60 % aller Tetrazykline); in der Broilermast wurden der Wirkstoff Tetrazyklin-HCL und in der Putenmast der Wirkstoff Chlortetrazyklin in bedeutenden Mengen eingesetzt. Daneben stellte die Gruppe der Sulfonamide 1997 in Weser-Ems

einen Anteil von mehr als 21 % aller verschriebenen Antibiotika über Herstellungsaufträge dar. Auch die Sulfonamide, vor allem Sulfadiazin und Sulfamethazin wurden hauptsächlich in der Schweinemast eingesetzt. Insgesamt wurde eine Gesamt-Reinwirkstoffmenge in tierärztlichen Herstellungsaufträgen (n=30.693) für Antibiotika von ca. 66 t ermittelt. Abbas et al. 2001 führten eine vergleichbare Studie im Land Brandenburg (1998/1999) durch. Die Gesamt-Reinwirkstoffmenge für Antibiotika in tierärztlichen Herstellungsaufträgen (n=1.004) betrug 6,6 t. Auch hier machte der Anteil der Tetrazykline mehr als 68 % der über die Herstellungsaufträge erfassten Antibiotika aus. Sulfonamide stellten ca. 9 % des über die Herstellungsaufträge erfassten Gesamt-Antibiotikaeinsatzes dar.

2.3 Untersuchungen zur Persistenz von Tierarzneimitteln in Masthähnchenfestmist und anderen Wirtschaftsdüngern

Die in der Nutztierhaltung eingesetzten Antibiotika werden zu veränderlichen Anteilen in intakter Form oder metabolisiert über den Kot bzw. Harn ausgeschieden (s. Kap. 2.1). Da die Ausscheidungen normalerweise als Gülle (ein Kot-Harn-Gemisch) oder vermischt als Einstreu als Festmist vorliegen, ist eine differenzierte Betrachtung der Ausscheidungen über Kot oder über Harn im vorliegenden Fall nicht notwendig. In der Regel werden die Wirtschaftsdünger nach unterschiedlicher Lagerungszeit auf den Boden aufgebracht. Festmist aus der Masthähnchenproduktion wird häufig auf Stallmistlagerstätten oder am Feldrand zwischengelagert bzw. während der Vegetationsperiode sofort als Dünger ausgebracht. Gülle wird unterhalb der Spaltenböden gelagert bzw. in einem Fließmistsystem aus dem Stall über eine Vorgrube in einen Güllebehälter transportiert, aus dem dann in unregelmäßigen Abständen die Gülle zum Ausbringen abgepumpt wird. Je nach Jahreszeit, Witterungslage und Lagerungskapazität variieren die Lagerungszeiten von einigen Wochen bis zu über 6 Monaten.

Die Ausbringung von Wirtschaftsdüngern auf landwirtschaftlich genutzte Flächen regelt die Düngeverordnung (DüngeVO 1996). So dürfen Wirtschaftsdünger nicht auf gefrorenen Boden sowie zwischen Mitte November und Mitte Januar ausgebracht werden.

Auch die zum Zeitpunkt der Ausbringung vorliegenden Gehalte der Antibiotika in den Wirtschaftsdüngern sind von einer Reihe von Einflussfaktoren abhängig. Eine wichtige Rolle spielt vor allem bei Gülle der Verdünnungseffekt durch bereits vorhandene unbelastete Gülle sowie die weitere Vermischung mit antibiotikafreien Ausscheidungen im Anschluss an den Behandlungszeitraum. Als Einflussfaktoren auf das Lagerverhalten von Antibiotika in Wirtschaftsdüngern kommen in erster Linie Temperatur, Belüftung bzw. Sauerstoffeintrag (Langhammer 1989) und physikochemische Eigenschaften der Matrix wie der pH-Wert (Kroker 1983) in Frage. Es existieren zu dieser Fragestellung bisher nur wenige Untersuchungen.

Tetrazykline

Tetrazykline werden nach Kroker (1983) und Grafe (2001) zu etwa 80 % über den Kot ausgeschieden. Beim Schwein wurden Konzentrationen von bis zu 800 mg/kg bei praxisüblicher Medikation in frischen Exkrementen ermittelt (Grafe 2001).

Winckler und Grafe (2000) stellten für Tetrazyklin eine hohe Lagerstabilität in Schweinegülle fest. Nach 7 Wochen hatte die Konzentration im günstigsten Fall um 50 % abgenommen. Die Autoren leiten daraus eine Halbwertszeit für Tetrazyklin zwischen 46 und 106 Tagen ab. Der Einfluss von Ausgangskonzentration, Umgebungstemperatur und Lufteintrag durch zeitweiliges Aufrühren wird als gering eingeschätzt.

Kühne und Agthe (2000) ermittelten dagegen *in vitro* bei kleinem Probenvolumen TC-Halbwertszeiten von 9 Tagen bei unbelüfteter bzw. 4,5 Tagen bei belüfteter Schweinegülle.

Orientierende Angaben zu den tatsächlich in der Praxis anzutreffenden Tetrazyklinkonzentrationen in Gülle finden sich bei Grafe (2001). Im Rahmen einer Screening-Untersuchung von 181 Schweinegülleproben auf Tetrazyklin-HCl/4-Epi-Tetrazyklin enthielten 24 % Rückstände oberhalb der Bestimmungsgrenze von 0,6 mg/kg. Der mittlere Tetrazyklingehalt betrug 11,4 mg/kg bei einer Schwankungsbreite zwischen 0,6 mg/kg und 66 mg/kg. Leider konnten aufgrund der anonymisierten Probenahme keine Angaben zum Zeitpunkt eines Medikamenteneinsatzes oder der Lagerungsbedingungen erhoben werden (Grafe 2001).

Güllen, mit denen niedersächsische Bodendauerbeobachtungsflächen beaufschlagt wurden, enthielten ca. 4 mg/kg Tetrazyklin sowie 0,1 mg/kg Chlortetrazyklin (Hamscher et al. 2002).

Zhu et al. (2001) ermittelten in 23 von 26 Proben aus Gülle-Lagunen in Nebraska Tetrazykline in Konzentrationen von 3 µg/kg bis 12 mg/kg (Bestimmungsgrenze 3,1 bis 3,8 µg/kg).

Bezüglich der Persistenz in Hühnerfestmist liegen nur sehr wenige Erkenntnisse vor. Jagnow (1977) untersuchte mit mikrobiologischen Testverfahren die Stabilität von Tetrazyklinen. In einem *in-vitro*-Ansatz wurden durch das Einmischen in Hühnerkot Konzentrationen von 10 mg/kg eingestellt. Während einer 12-wöchigen Lagerungsdauer wurde unter Laborbedingungen (konstant 20 °C) ein Rückgang der antimikrobiellen Aktivität um 65 % beobachtet und vom Autor als Abbau interpretiert. Unter Freilandbedingungen blieb die Tetrazyklin-Aktivität mehrere Monate erhalten.

Eine weitere Untersuchung beschäftigte sich mit der antimikrobiellen Aktivität von Chlortetrazyklin gegenüber *Bacillus cereus* in mit Hühnerkot vermischem Boden, die sich bei einer Bodentemperatur von 30 °C nach 30 Tagen auf 44 %

reduzierte. Dagegen zeigte Chlortetrazyklin bei Bodentemperaturen zwischen 4 und 20 °C eine hohe Persistenz (Gavalchin & Katz 1994).

Sulfonamide

Sulfamethazin wird vom Schwein zu 46 %, davon zu 50 % in acetylierter Form (N4-Acetyl-Sulfamethazin) wieder ausgeschieden. Bei der Lagerung der rückstandshaltigen Gülle trat während der ersten 21 Tage eine Reaktivierung des Metaboliten auf, erst danach kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme des Wirkstoffes (Berger 1986).

Eine 8-tägige Medikation eines Schweinebestandes mit einem Kombinationspräparat aus den Sulfonamiden Sulfamethazin und Sulfadiazol sowie dem Sulfonamid-Synergisten Trimethoprim führte zu Gesamt-Sulfonamidkonzentrationen inkl. konjugierter Metabolite von bis zu 39 mg/kg in der Gülle. Die Rückstände bauten sich in fünf Wochen um 40-60 % ab, Trimethoprim war nicht mehr nachweisbar (Langhammer 1989).

Haller et al. (2002) konnten mittels HPLC in 6 Schweinegülleproben aus Dunggruben in der Schweiz Konzentrationen von Sulfamethazin in Höhe von maximal 11,3 mg/kg einschließlich des Metaboliten N4-Acetyl-Sulfamethazin nachweisen. Die Konzentration des nicht antimikrobiell wirkenden Metaboliten war 2- bis 50-mal niedriger als die Ausgangssubstanz, allerdings besteht nach Berger et al. (1986) die Möglichkeit der Umwandlung zurück zur Muttersubstanz. Sulfathiazol war in 4 Proben (maximal 12,4 mg/kg) nachweisbar, Trimethoprim lag nur in einer Probe in sehr niedriger Konzentration (< 0,1 mg/kg) vor (Haller et al. 2002).

Pfeifer et al. (2002) wiesen ebenfalls in 2 von 4 Schweinegülleproben Sulfadiazin (11-80 µg/kg), N4-Acetyl-Sulfadiazin (10-270 µg/kg) und Sulfamethazin (11-62 µg/kg) nach. Obwohl auch Trimethoprim während der Bestandsbehandlung verabreicht wurde, konnte es in keiner Probe

nachgewiesen werden. Die Autoren deuten dies als einen Hinweis darauf, dass Trimethoprim nicht stabil ist oder zur Komplexbildung neigt und daher nicht detektiert werden kann (Haller et al. 2002).

2.4 Untersuchungen zur Mobilität von Tierarzneimitteln in Böden

Im Boden mobile Tierarzneimittel können z. B. über das Sickerwasser ins Grundwasser gelangen. Es muß daher untersucht werden, ob und wie mobil diese Wirkstoffe sind. Entscheidend bei der Mobilität von Tierarzneimitteln im Boden sind die Sorptionsneigung eines Wirkstoffes bzw. die Mechanismen, die bei der Sorption von Antibiotika an Bodenbestandteilen beteiligt sind. Stark sorbierende Substanzen können in der Umwelt, hier speziell im Boden akkumulieren (Tolls 2001; Höper et al. 2002). In diesem Fall ist im Hinblick auf die ökotoxikologische Bewertung die Verfügbarkeit dieser Substanzen im Boden für die im Boden lebenden Organismen von Bedeutung.

Literaturauswertungen (Tab. 3) haben für die untersuchten Antibiotika einen niedrigen n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log K_{ow}$) ergeben. Die Wirkstoffe weisen in der Regel eine gute Wasserlöslichkeit auf (Tolls 2001; Höper et al. 2002).

Tetrazykline und Chinolone weisen eine starke Sorptionsneigung an feste Bodenbestandteile auf (Tetrazykline: K_f bis 1620 ml/g an Torf; Enrofloxacin: K_f bis 6300 ml/g an Tonminerale). Aufgrund dieser Werte werden diese Wirkstoffe als immobil angesehen. Im Vergleich dazu bewegt sich K_f für Sulfamethazin in der Spanne von 0,6 bis 3,1 ml/g, was als geringe Sorptionsneigung an feste Bodenpartikel interpretiert wird (Tolls 2001).

Tabelle 3: Löslichkeit (S), n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (K_{ow}) und Adsorptionskoeffizienten an die Bodenmatrix (K_f) sowie an die organische Substanz (K_{oc}) und an Kationen von ausgewählten Tierarzneimittelwirkstoffen (Tolls 2001; Rabølle und Spliid 2000; Höper et al. 2002)

	S (g/l)	log K_{ow} (ml/g)	K_f (ml/g)	K_{oc} (ml/g)	Log K_f Kationen (ml/g)
Tetrazyklin (TC)	1,7	-1,19	> 400, 1140-1620 ¹	(4206- 6059) ²	Al ³⁺ : 12,5 Fe ³⁺ : 13,4
Chlor-TC	8,6	-			
Oxy-TC	1	-1,22	420-1030	27.800- 93.300	Fe ³⁺ : 9,8 Mg ²⁺ : 3,9
Sulfadiazin	0,08	-0,09	-	-	-
Sulfamethazin	1,5	0,89	0,6-3,1	60-208	-
Tylosin	5	3,5	8,3-128	550-7990	-
Enrofloxacin	130	1,1	500-5610 3500-6300 ³	16.500- 770.00	-

¹ Adsorption an Torf

² an gelöstem organischem Kohlenstoff

³ an Tonmineralen

Die $K_{d,DOM}$ –Werte, die nur die Sorptionsneigung an gelöste organische Substanzen beschreiben, variieren für Tetrazykline von 1500 bis 2000 l/kg und zwischen 100 und 53000 l/kg für Chinolone. Die große Spannweite bei den Chinolonen wird durch unterschiedliche Messmethoden, verschiedene organische Substanzen und pH-Wert-Unterschiede erklärt (Tolls 2001; Holten Lützhøft et al. 2000; Schmitt-Kopplin et al. 1999). Deutlich wird jedoch laut Sithole und Guy (1987) anhand dieser Koeffizienten $K_{d,DOM}$ und K_f , dass die Bindung von Antibiotika zu gelöstem organischem Material stärker ist als zu festen Bodenpartikeln.

Tetrazykline

Rabølle und Spliid (2000) untersuchten das Sorptionsverhalten und die Verlagerbarkeit von Oxytetrazyklin und Tylosin in verschiedenen Bodentypen

(Sand, sandiger Lehm, lehmiger Sand). Dabei stellten sie fest, dass Oxytetracyclin eine hohe Sorption an Bodenpartikel zeigte, wobei die jeweiligen Bodentypen keinen Unterschied machten. Tylosin sorbierte signifikant stärker an die Bodenfraktion je höher der Tonanteil der Böden war. 60 bis 80 % des Tylosins wurde in sandigem Lehm in 5 cm Tiefe verlagert, in sandigem Boden dagegen bis in 25 cm Tiefe.

Lindsey et al. (2001) wiesen Tetracykline in 9 von 138 Proben aus Oberflächengewässern in Konzentrationen von 0,07 mg/l OTC, 0,07 bis 1,34 µg/l TC und 0,11 µg/l CTC nach. Im Grundwasser (6 Proben) waren keine Tetracykline nachweisbar. Die Autoren vermuten, dass ein run-off der Substanzen in die Oberflächengewässer wahrscheinlicher ist als ein Eintrag ins Grundwasser durch Auswaschung der Böden.

Zhu et al. (2001) bestätigten diese Ergebnisse: in Grundwasserproben von 11 Orten in Nebraska im Abflussbereich von Gülle-Lagunen konnten keine Tetracykline (OTC, TC, CTC) oberhalb der Nachweisgrenze (0,21 bis 0,28 µg/l) nachgewiesen werden.

Von 14 Boden-Dauerbeobachtungsflächen wurden 2000 und 2001 Bodenproben (0 bis 30 cm Tiefe) entnommen und mittels LC-MS-MS auf Tetracykline untersucht (Höper et al. 2002; Hamscher et al. 2002). In Böden Milchvieh haltender Betriebe und Böden, die Klärschlamm erhalten hatten, konnten keine Tierarzneimittel gefunden werden. Auf allen mit Schweinegülle gedüngten Böden wurden Tetracyclin und Chlortetracyclin nachgewiesen, was eine Pilotstudie ebenfalls ergeben hatte (Hamscher et al. 2000). Die Konzentrationen lagen zwischen < 50 und 158 µg/kg für Tetracyclin und 5 bis 17 µg/kg für Chlortetracyclin. In einer Güllekruste konnten 1435 µg/kg Chlortetracyclin gemessen werden (Höper et al. 2002). Hinweise auf eine Akkumulation von Tetracyclinen im Boden ergeben sich aus dem Anstieg der Tetracyclinkonzentration nach erneuter Gülleapplikation. Eine Verlagerung der

Tetrazykline in den Unterboden gilt aufgrund der Untersuchungsergebnisse als unwahrscheinlich. Der isolierte positive Nachweis von Chlortetrazyklin im Unterboden (30-60 cm) eines ackerbaulich genutzten Niedermoorstandorts ist möglicherweise auf Verschleppung bei der Probennahme zurück zu führen.

In derselben Studie war in mittels Saugsonden aus 80 und 120 cm Tiefe gewonnenem Bodenwasser sowie in oberflächennahem Grundwasser (200 cm) keiner der untersuchten Wirkstoffe nachzuweisen (Höper et al. 2002).

Sulfonamide

Hirsch et al. (1998) untersuchten Kläranlagenabläufe, oberirdische Gewässer und Drainagegräben auf Antibiotikarückstände. Von 18 untersuchten Wirkstoffen (human- und veterinärmedizinisch eingesetzten Substanzen) konnten fünf in Konzentrationen von weniger als 1 µg/l nachgewiesen werden, darunter das Sulfonamid Sulfamethoxazol sowie Trimethoprim.

Hartig et al. (1999) untersuchten mittels HPLC-MS-MS 5 Oberflächen-gewässerproben auf 13 Sulfonamide (u.a. Sulfamethizol, Sulfadiazin, Sulfamethoxazol) und wiesen in 4 Proben Sulfamethoxazol in Konzentrationen von 30 bis 85 ng/l nach. In 3 Proben von Berliner Kläranlagenabflüssen ergab die Analyse Konzentrationen für die drei oben genannten Sulfonamide zwischen 5 und 2460 ng/l.

Lindsey et al. (2001) konnten in einer von 6 Proben Grundwasser positiv auf das Sulfonamid Sulfamethoxazol testen (0,22 µg/l).

In Böden (Acker, 0 bis 30 cm) niedersächsischer Dauerbeobachtungsflächen ermittelten Höper et al. (2002) Sulfamethazinkonzentrationen von 0,3 bis 11 µg/kg. Eine Verlagerung in den Unterboden (bis 90 cm) konnte für Sulfonamide nicht nachgewiesen werden, ebenso wie auch in allen Grundwasserproben aus 200 cm Tiefe und im Bodenwasser aus 80 und 120 cm Tiefe keine Sulfonamide messbar waren.

Boxall et al. (2002) untersuchten das Sorptionsverhalten von Sulfachlorpyridazin in einem Ton- und Sandboden. Sie fanden heraus, dass das Sulfonamid nach Aufbringung auf den Tonboden durch Drainagewasser schnell in Oberflächenwasser transportiert wurde und dort in Konzentrationen bis zu 590 µg/kg nachweisbar war, also eine geringe Sorptionsneigung aufweist. Auf sandigem Boden dagegen konnten im Sickerwasser nur Konzentrationen um oder unter der Nachweisgrenze von 250 ng/l gefunden werden. Die Autoren interpretieren dies als möglicherweise schnellen Abbau des Sulfonamids im Sandboden.

3 Teilvorhaben 1: Modellversuche zur Persistenz von Tetrazyklin in Geflügelfestmist und Nachweis ausgewählter Tierarzneimittel in Schweinegülleproben

3.1 Entwicklung einer Nachweismethode für Tetrazyklin-HCL in Masthähnchenfestmist mittels HPLC

Grundlage für die experimentellen Untersuchungen im Rahmen des Teilvorhabens 1 bildete die Methodenentwicklung zum Nachweis von Tetrazyklin-HCL und 4-Epi-Tetrazyklin-HCL in Masthähnchenfestmist mittels HPLC. Frischer, unbearbeiteter Geflügelfestmist besteht zu veränderlichen Gewichtsanteilen aus Kot und Stroh und weist damit neben einer stark inhomogenen Struktur eine hohe Variabilität in Nährstoff- und Trockensubstanzgehalt auf. Eine Vielzahl von organischen Substanzen und unterschiedliche Gehalte an zwei- und dreiwertigen Kationen (Calcium, Magnesium etc.) erschweren den Nachweis der Tetrazykline, da Tetrazykline zum Teil irreversible Chelatkomplexe mit diesen Stoffen eingehen. Darüber hinaus erfolgt durch die Zugabe von Stroh als Einstreu eine Verdünnung des Substrates, obwohl Tetrazyklin weiterhin stärker an Kotbestandteile gebunden bleibt.

Da Tetrazykline bei hohen Temperaturen instabil sind (Kühne et al. 2001), konnte keine gewöhnliche Trocknung bei 105 °C erfolgen. Daher wurde eine Gefriertrocknung durchgeführt und der Mist anschließend gemahlen. Durch diese Vorgehensweise wurde ein homogenes Substrat unter größtmöglicher Schonung des Wirkstoffs Tetrazyklin erzielt.

Die nachfolgend beschriebene Methode basiert auf den Vorarbeiten von Grafe (2001) zu Tetrazyklin in Schweinegülle. Die Nachweisgrenze beträgt 1 mg/kg im Ausgangsmaterial.

Verwendete Chemikalien:

- Zitronensäure-Zitrat-Puffer (pH 4,8), 1 M
- Tetrazyklin-HCL (Sigma, Art. Nr. T-3383)
- 4-Epi-Tetrazyklin-HCL (Acros Organics, Art. Nr. 23312)
- Mobile Phase: Solvent A: 20 % Oxalsäure 0,01 M : 80 % Acetonitril
Solvent B: Acetonitril

HPLC-Konfiguration:

- Merck-Hitachi HPLC-System:
 - Pumpe L-7100
 - Autosampler L-7200
 - Solvent-Degasser L-7612
 - Interface D-7000
 - Säulenofen L-7360 (25 °C)
- Säule: Lichrospher 60 Select B 250-4 RP-18 (5 µm)
- Vorsäule: Lichrospher 100 RP-18 (5 µm)
- Flow: 0,8 ml/min
- Injektionsmenge: 20 µl
- UV-VIS-Detektor L-4250 (Messwellenlänge 350 nm)
- PC-Software D-7000 HPLC System Manager

Gradientenprogramm:

Zeit (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0,0	100,0	0,0
2,5	95,5	5,0
3,5	95,0	5,0
10,0	65,0	35,0
12,5	65,0	35,0
13,5	100,0	0,0

Ende der Datenaufnahme nach 15 min Laufzeit.

Probenvorbereitung:

Die frischen Geflügelfestmistproben wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden bei einer maximalen Stellflächentemperatur von 20 °C gefriergetrocknet und anschließend fein gemahlen. 2 g homogenisiertes Probenmaterial wurden mit Citratpuffer aufgefüllt (1:20). Nach Extraktion im Horizontalschüttler (Gerhardt; Programm 100) über 30 min wurde das Gemisch bei 6000 U/min für 10 min zentrifugiert (MinifugeT; Heraeus Sepatech). Der Überstand wurde durch einen Faltenfilter (Schleicher & Schüll, Ø 150 mm) gegeben. Das Filtrat wurde im Mikrospin-Zentrifugenfilter (Firma Roth, Volumen: < 2 ml) wiederum bei 4000 U/min für 20 min zentrifugiert. Die erhaltene klare Lösung wurde in Autosamplerfläschchen pipettiert und direkt der Messung zugeführt.

Auf Basis unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen im Frischmist ergab sich eine mittlere Wiederfindung von 94,9 % (Tab. 4).

Tabelle 4: Wiederfindung (%) von Tetrazyklin einschl. 4-Epi-Tetrazyklin in Masthähnchenfestmist

Probe	bei 5 mg/kg im Frischmist	bei 10 mg/kg im Frischmist
1	87,1	72,5
2	83,9	87,9
3	110,1	105,6
4	108,9	103,1
Mittelwert	97,5	92,3
STD	12,1	13,3

Standards:

Zur Kalibration wurden je Messtermin externe Standards für Tetrazyklin und für 4-Epi-Tetrazyklin in wässriger Lösung hergestellt. Der Kalibrationsbereich umfasste je nach Versuchsvariante und Zeitpunkt der Probenahme 0,5 mg/kg

bis 50 mg/kg, wobei Proben mit ähnlichen Wirkstoffgehalten in einem Durchgang analysiert wurden, um zu weite Kalibrationsbereiche zu vermeiden.

3.2 Ausscheidung von oral verabreichtem Tetrazyklin durch Masthähnchen

Das Ausscheidungsverhalten von über das Futter verabreichtem Tetrazyklin wurde an Masthähnchen (Herkunft: Ross) untersucht, die in institutseigenen Versuchsställen des Forschungs- und Studienzentrums für Veredelungswirtschaft Weser-Ems eingestallt waren.

3.2.1 Versuchsaufbau

Insgesamt 450 Masthähnchen-Eintagsküken wurden in 6 Gruppen à 75 Tiere aufgeteilt und in 6 Abteilen gehalten (Besatzdichte: 19 Tiere/m²). Die Haltung erfolgte in Anlehnung an die Bedingungen in der Praxis auf gehäckseltem Stroh als Einstreu (Abb. 3). Die Schlachtung erfolgte im Alter von 31 Tagen bei einem mittleren Mastendgewicht von 1,8 kg.

Fütterung:

Die Tiere erhielten während der ersten 10 Lebenstage ein Starter-, vom 11. bis 26. Masttag ein Mast- und schließlich ab dem 27. Lebenstag bis zum Schlachttermin ein Endmastfutter. Futter und Wasser standen über die gesamte Mastperiode zur freien Aufnahme zur Verfügung.



Abbildung 3: Masthähnchen-Eintagsküken im Abteil kurz nach der Einstallung

Dosierung:

Tetrazyklin-HCL wurde in 2 Dosierungen eingesetzt, je Versuchsglied standen 150 Tiere zur Verfügung.

Variante A: 0,5 g TC/kg Futter (Gruppen V1 und V3)

Variante B: 1,0 g TC/kg Futter (Gruppen V4 und V6)

Variante C: Kontrolle (Gruppen V2 und V5)

Die Futterdotierung erfolgte während der ersten 10 Lebenstage über das Starterfutter. Insgesamt nahmen die Tiere der Variante A 10,01 g (V1) bzw. 9,98 g (V3) und die Tiere der Variante B 18,68 g (V4) bzw. 20,58 g (V6) Tetrazyklin über das Futter auf; diese Mengenangaben wurden um Futter- und Einmischverluste korrigiert.

Probennahme:

Während der Tetrazyklinapplikation wurden in zweitägigem Abstand Kotproben aus den Abteilen entnommen. Es handelt sich hierbei um Mischproben je Abteil, da aufgrund der geringen Kotalausscheidung eines Kükens keine Einzeltierbeprobung möglich war. Somit konnten keine tierindividuellen Ausscheidungsraten sondern lediglich die durchschnittliche Konzentration des eingesetzten Wirkstoffes ermittelt werden. Nach dem Absetzen des Antibiotikums wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen täglich Mischproben entnommen.

Die Mischproben wurden mittels auf die Einstreu gelegter roter Platten (Format A4, 3 je Abteil) gewonnen, auf denen die Tiere über einen definierten Zeitraum Kot absetzten. Zusätzlich wurde mittels eines Stanzzylinders (Ø 5,5 cm, Länge 20,5 cm) in der Mitte der Mastperiode und beim Ausstallen je Abteil eine Mischprobe aus der Mistmatte entnommen. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung (vgl. Kap. 3.1) bei -18 °C gelagert.

3.2.2 Ergebnisse

Im Folgenden sind die Gesamtkonzentrationen von Tetrazyklin sowie des Hauptmetaboliten 4-Epi-Tetrazyklin in den frischen Ausscheidungen der jeweiligen Masthähnchengruppen dargestellt. Für alle Konzentrationsangaben gilt, dass sie nicht um die Wiederfindung korrigiert wurden da die Wiederfindung nahe 100 % lag.

Erst ab Tag 5 konnte aufgrund der geringen Kotabsatzmengen der Tiere genügend Probenmaterial für die TC-Analyse gewonnen werden. Daher beginnt die Dokumentation der TC-Ausscheidungen zu diesem Zeitpunkt. An Tag 11 nach der Einstellung erfolgte der Wechsel von Starterfutter auf Mastfutter. Somit stellt dieser Zeitpunkt das Ende der TC-Applikation dar. Bis zum 7. Tag nach Absetzen der Medikation wurden täglich Kotproben entnommen.

In Abbildung 4 ist der Verlauf der Ausscheidung von Tetrazyklin während und nach der Applikation für Variante A (0,5 g TC/kg Futter) dargestellt.

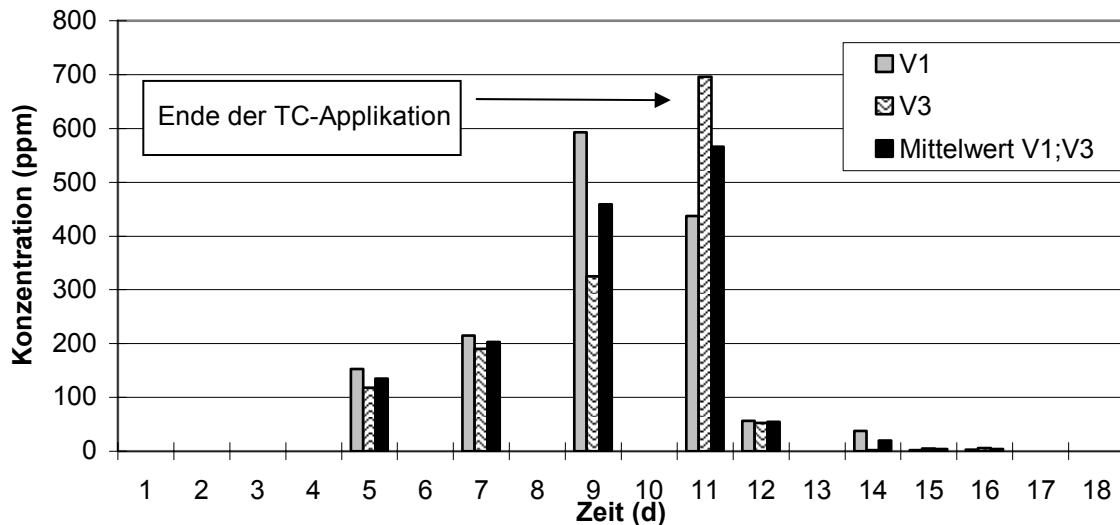


Abbildung 4: Verlauf der Gesamt-TC-Konzentration einschließlich 4-Epi-Tetracyklin (mg/kg) in den frischen Ausscheidungen der Gruppe A (Tiere der Gruppen V1 und V3; 0,5 g TC/kg Futter)

Es wird bei beiden Tiergruppen der Variante A deutlich, dass die TC-Konzentration in den Ausscheidungen der Masthähnchen während der TC-Gabe stetig anstieg. Die höchste TC-Ausscheidung erfolgte in den letzten 3 Behandlungstagen. Die Gruppen unterschieden sich bei gleicher Applikationsdauer und -menge hinsichtlich Höhe und Zeitpunkt der maximalen Ausscheidung (V1: ca. 600 mg/kg an Tag 9, V3: ca. 700 mg/kg an Tag 11). Dieser Unterschied könnte auf die inhomogene Struktur des Probenmaterials zurückzuführen sein.

Der Abfall der TC-Konzentration nach Absetzen des Tierarzneimittels begann bei beiden Gruppen mit dem Futterwechsel, wobei V1 einen etwas weniger steilen Verlauf zeigte (V1: ca. 91 % Rückgang im TC-Gehalt innerhalb 3 Tagen, V3: ca. 94 % innerhalb 2 Tagen).

Die Konzentration an TC in den Ausscheidungen der höher dosierten Fütterungsgruppe B (Abb. 5) zeigte einen ähnlichen Verlauf wie in Gruppe A. Auch hier war mit dem Ende der Medikation an Tag 11 ein starker Abfall der

Wirkstoffkonzentration im Hühnerkot zu verzeichnen. Auffällig ist wieder der unterschiedliche Zeitpunkt der jeweiligen Maximalkonzentration an TC. Bei V4 lag dieser bei ca. 740 mg/kg an Tag 9, wogegen in V6 mit ca. 860 mg/kg erst an Tag 11 die Maximalkonzentration erreicht wurde. Vergleicht man beide Fütterungsvarianten direkt miteinander, so wies die um 100% höher dotierte Variante B (1 g TC/kg Futter) grundsätzlich höhere Konzentration an TC im Kot auf. Die Wirkstoffausscheidung lag allerdings nur um durchschnittlich 50 % höher.

Beiden Fütterungsvarianten ist gemeinsam, dass Tetrazyklin bis zum fünften Tag nach der letzten Tetrazyklingabe in den Ausscheidungen der Gruppen noch nachweisbar war (Abb. 6).

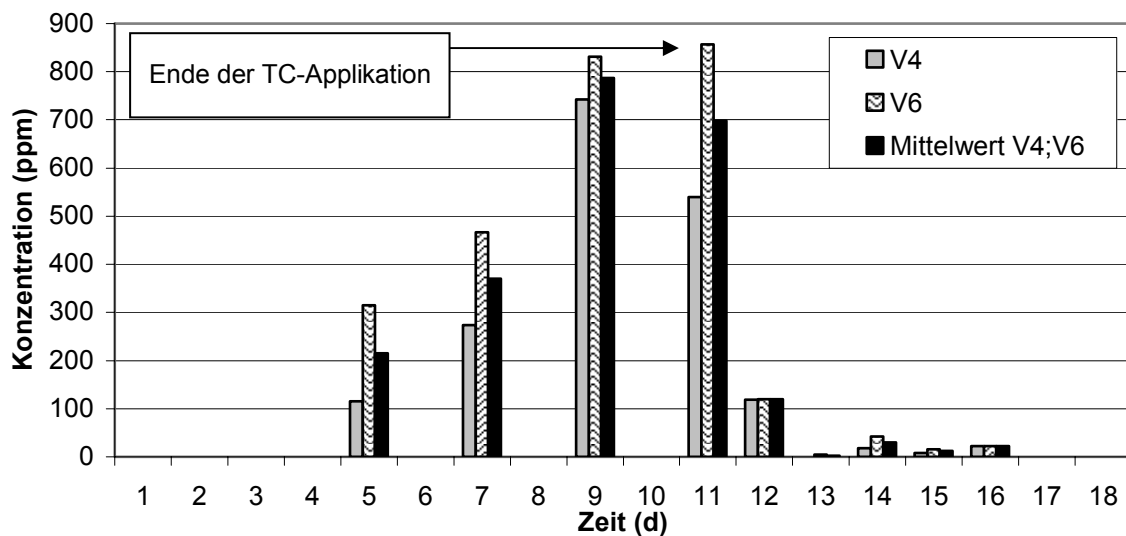


Abbildung 5: Verlauf der Gesamt-TC-Konzentration (mg/kg) einschließlich 4-Epi-Tetrazyklin in den frischen Ausscheidungen der Variante B (Tiere der Gruppen V4 und V6; 1,0 g TC/kg Futter)

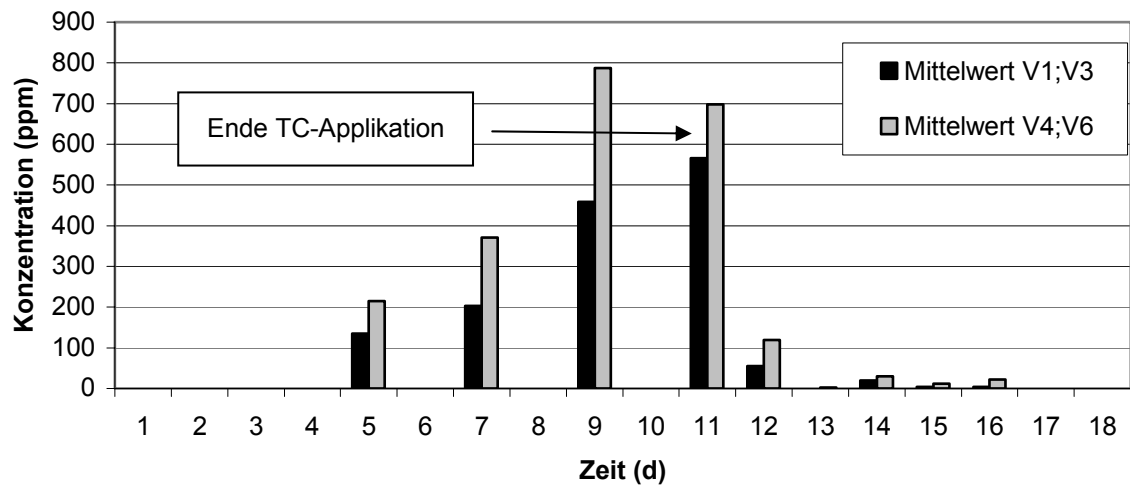


Abbildung 6: Verlauf der mittleren Gesamt-TC-Konzentration (mg/kg) einschließlich 4-Epi-Tetrazyklin in den frischen Ausscheidungen der Varianten A und B im Vergleich

3.3 Persistenz von Tetrazyklin in Masthähnchenfestmist

Die Untersuchungen zur Persistenz von Tetrazyklin in Masthähnchenfestmist wurden mit handelsüblichen Kunststoffbehältern zur Schnellkompostierung durchgeführt. Mit diesen Kompostern kann eine gewisse Wärmedämmung durch die rundum doppelwandig ausgeführte Konstruktion erreicht werden. Der aus Versuch 3.2 angefallene Masthähnchenfestmist wurde über einen Zeitraum von 3 Monaten unter weitgehend aeroben bzw. anaeroben Bedingungen gelagert. Die Lagerung erfolgte von Mitte März 2002 bis Anfang Juni 2002. Die Kompostbehälter wurden anstelle einer Mietenlagerung gewählt, da so trotz der geringen Festmistmenge eine Kompostierung des Materials und eine Begrenzung der (relativen) Oberfläche möglich war.

3.3.1 Versuchsaufbau

Der Festmist aus den Gruppen V1 bis V6 wurde in jeweils einen Kompostbehälter (Fassungsvermögen 165 l) gefüllt. Der als Kunststoffnetz (Maschenweite 10 mm) ausgeführte Boden der Komposter gewährleistete eine Belüftung von unten. Die Deckelklappen der Komposter blieben während des Versuchs geöffnet (Abb. 7). Je Fütterungsvariante wurde der Mist einer Gruppe weitgehend aerob beziehungsweise anaerob gelagert. Auch die wirkstofffreien Kontrollen wurden entsprechend behandelt. Bei weitgehend aerober Lagerung wurde der Mist in den Behältern locker aufgeschichtet. Nach 6 Wochen wurde das Substrat einmal umgesetzt und dabei gründlich durchmischt (Abb. 8). Im Gegensatz dazu wurden vergleichsweise anaerobe Verhältnisse durch starkes Komprimieren des Mistes in den Behältern erzielt. In diesem Fall erfolgte kein Umsetzen. Die Lagerung fand in einem vor Wind, Regen und starken Temperaturschwankungen geschützten Raum statt. Tab. 5 zeigt die Versuchsanordnung und -bedingungen.



Abbildung 7: Masthähnchenfestmist in den Kompostbehältern



Abbildung 8: Durchmischter Festmist beim Umsetzen der aeroben Lagerungsvariante

Tabelle 5: Übersicht zu Versuchsanordnung und –bedingungen bei der Untersuchung der Persistenz von Tetracyclin in Masthähnchenfestmist

Parameter	aerobe Lagerung	anaerobe Lagerung
Ausgangskonzentration	V1: 0,5 g TC/kg Futter V4: 1,0 g TC/kg Futter V2: Kontrolle	V3: 0,5 g TC/kg Futter V6: 1,0 g TC/kg Futter V5: Kontrolle
Temperatur	Raumtemperatur	Raumtemperatur
Probenahme	alle 14 Tage	alle 14 Tage
Probenart	Mischprobe aus 2 Höhen	Mischprobe aus 2 Höhen

Zur Erfassung der Umgebungs- und der Lagerungstemperatur im Komposter wurden insgesamt 13 Temperaturfühler an einen Datenlogger angeschlossen. Ein Fühler registrierte die Umgebungstemperatur und je zwei Fühler pro Komposter wurden in unterschiedlichen Höhen in die Kernzone des Festmistes eingebracht. Abbildung 9 zeigt die Anordnung der Versuchsglieder.

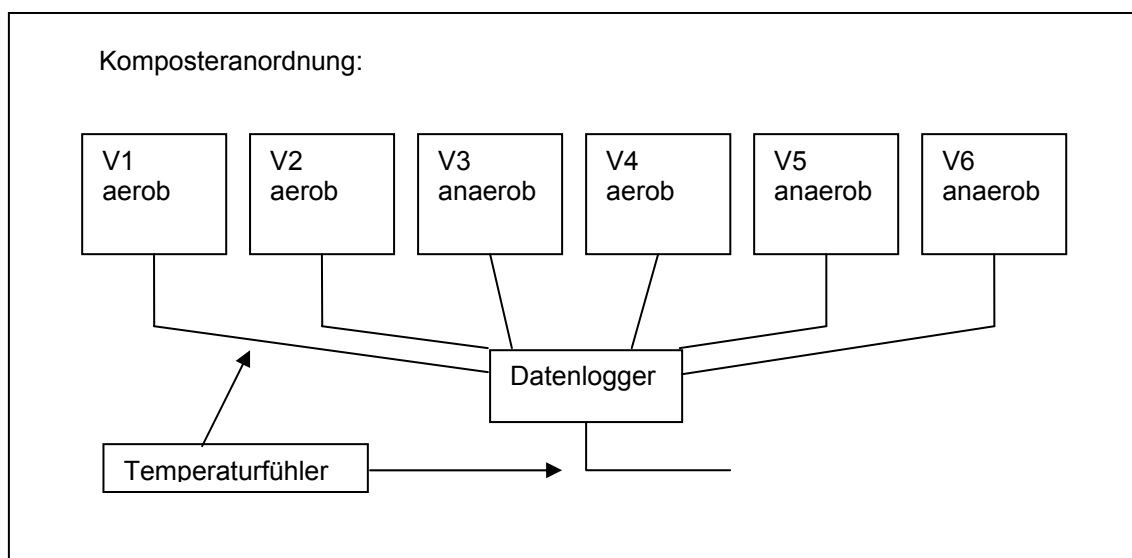


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung beim Lagerungsversuch

Probenahme:

Da eine vollständige Homogenisierung des Masthähnchenfestmistes durch die feste Struktur während der Lagerung nicht möglich war, erfolgte mit Hilfe einer eigens dafür entwickelten elektrisch angetriebenen Fräse (Ø 6 cm, Länge 41 cm) eine repräsentative Probennahme aus zwei unterschiedlichen Höhen des Komposters. Diese wurden als Mischproben weiter behandelt. Die Behälter waren für diesen Zweck vor der Befüllung mit Bohrlöchern versehen worden. Es wurde direkt aus der Mitte des Lagergutes eine ca. 3 cm dicke Mistprobe entnommen. An jedem Probenahmetermin wurde über einen anderen Zugang in den Mist gefräst, um stets ungestörte Proben zu erhalten. Das nicht benötigte Probenmaterial wurde wieder in das jeweilige Fräsloch zurückgegeben.

3.3.2 Ergebnisse

Der für diesen Versuch verwendete Masthähnchenfestmist stammte aus dem Versuch wie in Kapitel 3.2 beschrieben. Daher waren die Mistzusammensetzung und auch die Belastung mit Tetrazyklin bekannt. Nach dem Ausstallen der Masthähnchen wurden die Kompostbehälter innerhalb von 24 Stunden befüllt. Auch in der Praxis werden die Ställe umgehend ausgemistet und der Mist in größeren Mieten gelagert oder direkt auf das Feld ausgebracht. Tabelle 6 führt die Ausgangsbedingungen des Festmistes zu Beginn der Lagerung auf. Ebenfalls aufgeführt ist die Mistmenge je Gruppe, die in die Behälter gefüllt wurde. Für die folgende Darstellung der Ergebnisse wurden wie schon in Kapitel 3.2 die TC-Konzentrationen nicht um die Wiederfindung korrigiert.

Tabelle 6: Kenngrößen des im Lagerungsversuch eingesetzten Geflügelfestmistes zu Beginn der Lagerung (bezogen auf Trockensubstanz (%))

	V1	V2	V3	V4	V5	V6
TS (%)	48,6	50,4	48,6	52,9	50,5	53,9
N (%)	5,68	5,59	5,82	5,43	5,52	5,46
C (%)	41,52	41,26	40,75	41,04	41,07	40,71
OS (%)	86,56	86,66	86,10	87,06	86,92	86,92
C/N	7,3 : 1	7,4 : 1	7,0 : 1	7,6 : 1	7,4 : 1	7,5 : 1
TC (mg/kg)	24,65	0,0	41,78	52,91	0,0	95,00
Mist (kg) ¹	78,25	76,55	88,65	72,40	88,55	93,15

Legende: V1;V3: Mist aus Variante A
V4;V6: Mist aus Variante B
V2;V5: Mist aus Variante C; vergl. Kap. 3.2.1
¹ Frischmist

Durch das Verdichten wurde zwischen 10 und 15 kg mehr Mist in die „anaeroben“ Behälter eingefüllt. Im Verlauf der Lagerung erhöhte sich der Trockensubstanzgehalt des Mistes um durchschnittlich 13 %. Der beobachtete Anstieg im TS-Gehalt ist vor allem auf die Temperaturentwicklung zu Beginn der Lagerung (Abb. 10) und entsprechende Verdunstungsprozesse zurückzuführen.

Um die für Kompostiervorgänge notwendige Materialfeuchte zu gewährleisten, wurde das Lagergut von Zeit zu Zeit kontrolliert bewässert. Um diese externe Zufuhr von Wasser zu berücksichtigen, werden die Ergebnisse im Folgenden auf die Trockensubstanz bezogen dargestellt.

Die Stickstoff- und Kohlenstoffgehalte nahmen im Verlauf der Lagerung um durchschnittlich 1 bis 2 % bzw. um 4 bis 5 % ab. Etwa 10 % der organischen Substanz (OS) wurden abgebaut, wobei bei aerober Lagerung durchschnittlich etwa 2 % mehr OS abgebaut wurden als in der anaeroben Variante.

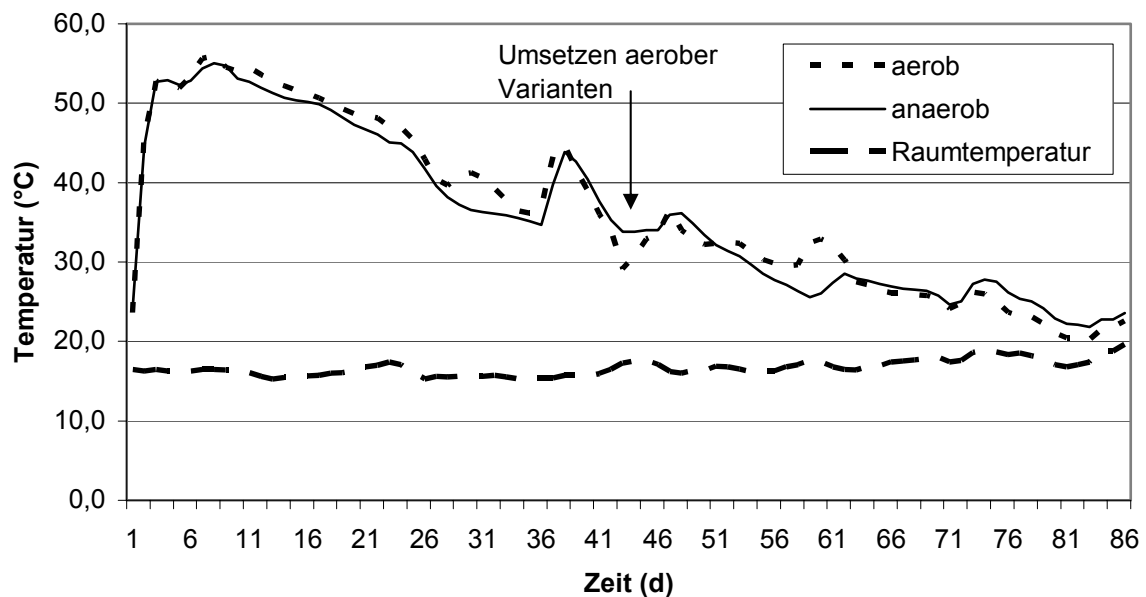


Abbildung 10: Mittlerer Temperaturverlauf der aeroben und anaeroben Varianten im Vergleich während der 3-monatigen Lagerung

Die Lagerungsart hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Temperaturentwicklung (Abb. 10). Während des ersten Monats lag die Temperatur im Festmist der aeroben Varianten geringfügig über der der anaeroben Varianten, ab dem Zeitpunkt des Umsetzens trat dieser Effekt nur noch zeitweise auf. Die Schwankungen in den jeweiligen Temperaturverläufen sind auf die kontrollierte Zugabe von Wasser und die dadurch angeregten Zersetzungsprozesse zurückzuführen.

Abbildung 11 zeigt die Temperaturverläufe in Abhängigkeit von der jeweiligen TC-Belastung des Festmistes. Während über die gesamte Lagerungsperiode gesehen keine deutlichen Unterschiede auftraten, wies Variante B mit der höchsten TC-Belastung vor allem zu Beginn der Lagerung die niedrigste Temperatur auf, wogegen bei Variante C als unbelastete Kontrolle die höchste Temperatur vorlag.

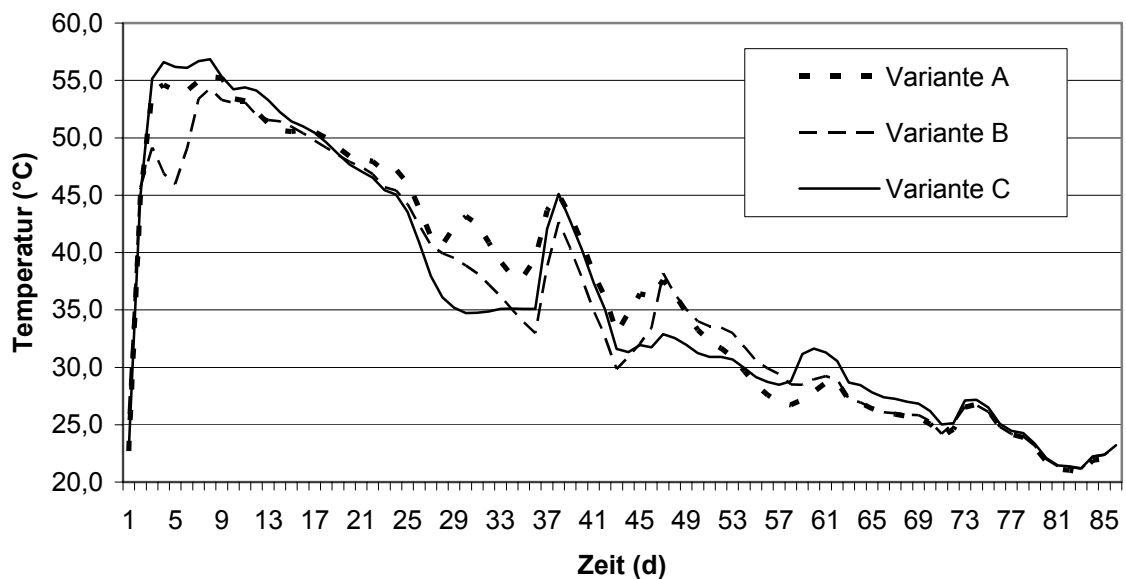


Abbildung 11: Mittlerer Temperaturverlauf der Varianten mit unterschiedlicher TC-Dosis (Variante A: 0,5 g TC/kg Futter; Variante B: 1,0 g TC/kg Futter; Variante C: Kontrolle)

Abbildung 12 veranschaulicht den Verlauf der Tetrazyklinkonzentration bei der Variante A (0,5 g TC/kg Futter) über den Lagerungszeitraum. Innerhalb der ersten 6 Tage erfolgte ein Temperaturanstieg im Rottegut von 22 °C auf 55 °C. In dieser Zeit ging die nachweisbare Tetrazyklinkonzentration bei V1 (aerobe Lagerung) von 24,7 mg/kg auf 7,3 mg/kg zurück. Bei dem Abbau des Tetrazyklins scheint es einen Zusammenhang zwischen Temperaturentwicklung und Abbau zu geben. Konzentrationsschwankungen wie zum Beispiel an Tag 29 sind vermutlich auf die Probenahme zurückzuführen. Durch die Inhomogenität des Mistes konnte nicht verhindert werden, dass mit der Probe Kot und Stroh in jeweils veränderlichen Anteilen entnommen wurden. Tetrazyklin aber findet sich deutlich stärker im Kot wieder als im Stroh-, bzw. Kohlenstoffanteil.

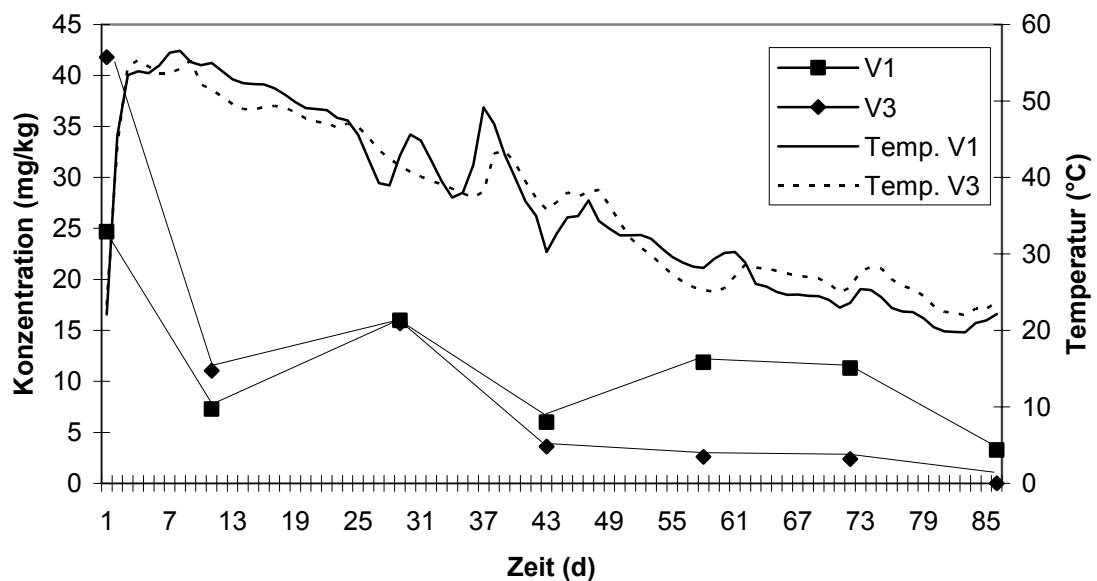


Abbildung 12: Verlauf der Konzentration an Tetrazyklin (mg/kg) im Masthähnchenfestmist der Variante A (0,5 g TC/kg Futter, Tiere V1 und V3) über die dreimonatige Lagerung, bezogen auf die Trockensubstanz (%)

Insgesamt fällt auf, dass bei anaerober Lagerung (V3) trotz höherer Ausgangskonzentration rasch geringere TC-Konzentrationen als bei V1 (aerobe Lagerung) erreicht wurden. Stellt man die Mittelwerte der TC-Konzentration aus V1 und V3 bezogen auf den Kohlenstoffgehalt des Mistes dar, um die unterschiedliche Probenzusammensetzung bezüglich Kot und Stroh zu berücksichtigen, zeigt sich ein gleichmäßigerer Verlauf (Abb. 13); es sind deutlich weniger Schwankungen im Konzentrationsverlauf festzustellen. Insgesamt sind am Ende der Lagerungsperiode von 3 Monaten bei der Variante A noch 0 % (V3) bei anaerober bzw. 13 % (V1) der Ausgangskonzentration bei aerober Lagerung an Tetrazyklin nachweisbar.

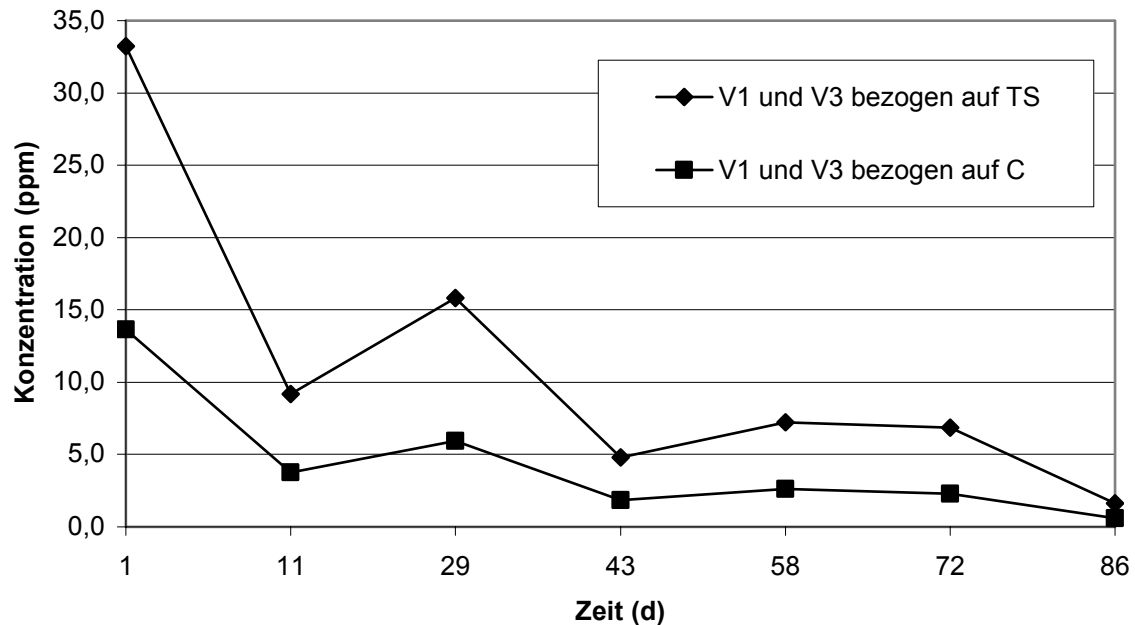


Abbildung 13: Mittlerer Verlauf der Konzentration an Tetrazyklin (mg/kg) im Masthähnchenfestmist der Variante A (0,5 g TC/kg Futter, Tiere V1 und V3) über die dreimonatige Lagerung, bezogen auf Trockensubstanz (%) sowie Kohlenstoff (%)

Ein ähnliches Bild ergab sich für die Abbaurrate von Tetrazyklin bei der Variante B (1 g TC/kg Futter) (Abb. 14). Die Tetrazyklinkonzentrationen überschritten jedoch während des gesamten Untersuchungszeitraumes deutlich die Werte für Variante A. Auch hier erfolgte der stärkste Tetrazyklinabbau innerhalb der ersten 11 Tage. In dieser Zeit stieg die Temperatur im Rottegut wie bei V1 und V3. Auch bei dem Mist aus Variante B lag kein Unterschied im Temperaturverlauf in Bezug auf die aerobe oder anaerobe Lagerung vor. Die anaerobe Lagerungsvariante V6 wies deutlich geringere TC-Konzentrationen auf als V4 (aerob), wobei für V4 an Tag 29 und 58 ein Konzentrationsanstieg zu verzeichnen ist. Auch hier hat die schon erwähnte Inhomogenität der Probe vermutlich einen Effekt auf die Konzentration. Dies wird auch bei der auf den Kohlenstoffgehalt bezogenen Darstellungsweise deutlich (Abb. 15). Ca. 20 bis 40 % der Ausgangskonzentration (Tab. 6) an Tetrazyklin waren nach dreimonatiger Kompostierung noch im Mist nachweisbar.

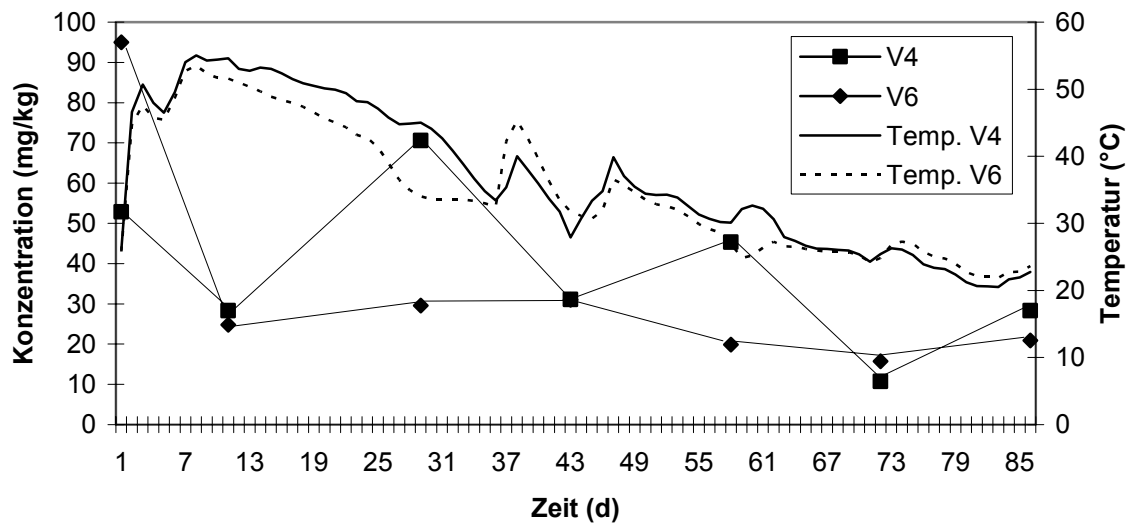


Abbildung 14: Verlauf der Konzentration an Tetrazyklin (mg/kg) im Masthähnchenfestmist der Variante B (1,0 g TC/kg Futter, Tiere V4 und V6) über die dreimonatige Lagerung, bezogen auf die Trockensubstanz (%)

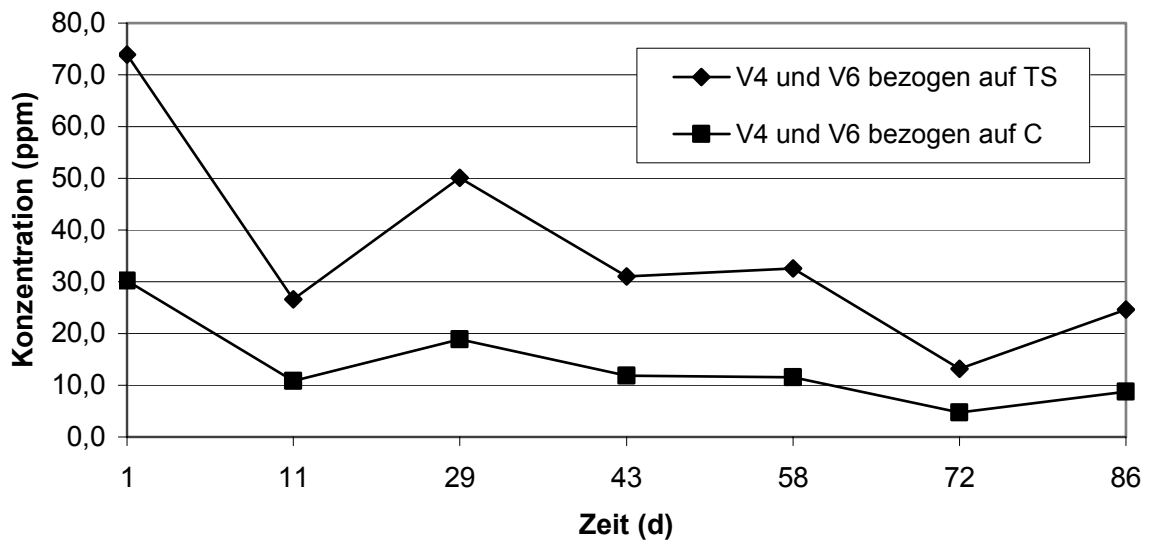


Abbildung 15: Mittlerer Verlauf der Konzentration an Tetrazyklin (mg/kg) im Masthähnchenfestmist der Variante B (1,0 g TC/kg Futter, Tiere V4 und V6) über die dreimonatige Lagerung, bezogen auf Trockensubstanz (%) sowie Kohlenstoff (%)

3.4 Screening: Nachweis ausgewählter Tierarzneimittel in Schweinegülleproben

3.4.1 Erweiterung der Nachweismethode für Tetrazykline und ausgewählte Sulfonamide

Grundlage für den Nachweis der Tetrazykline und der Sulfonamide in Schweinegülle bildete wiederum die von Grafe (2001) entwickelte Methode. Für das aktuelle Screening wurde diese Methode um Oxytetrazyklin/Epi-Oxytetrazyklin sowie Chlortetrazyklin/Epi-Chlortetrazyklin erweitert. Die Epimerformen sind jeweils als Hauptmetaboliten anzusehen. Zusätzlich wurde die Methode auf Sulfadiazin und Sulfamethazin/N4-Acetyl-Sulfamethazin aus der Gruppe der Sulfonamide ausgedehnt. Der Hauptmetabolit von Sulfadiazin ist nicht im Handel erhältlich, so dass nur ein qualitativer Nachweis erfolgen kann.

Gülle weist eine hohe Variabilität in Trockensubstanz- und Nährstoffgehalten auf und bildet aufgrund einer Vielzahl organischer Bestandteile im Gegensatz zu rein wässrigen Lösungen eine komplizierte Matrix. Eine frühere Studie konnte nachweisen, dass sich im Sediment der Gülle deutlich mehr Tetrazykline befinden als in der flüssigen Phase (Grafe 2001). Daher ist eine sorgfältige Homogenisierung schon bei der Probennahme, aber auch in allen weiteren Aufbereitungsschritten von großer Bedeutung.

Tetrazykline

Bis auf die beschriebenen Änderungen gelten für die nachfolgende Methode die HPLC-Einstellungen wie in Kapitel 3.1 dargestellt; zu beachten ist lediglich die wirkstoffspezifische Messwellenlänge von 350 nm.

Die Bestimmungsgrenze betrug 0,6 mg/kg für Tetrazyklin, 0,8 mg/kg für Chlortetrazyklin und 1,0 mg/kg für Oxytetrazyklin. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde bei der Auswertung der Screening-Proben jedoch eine

einheitliche Bestimmungsgrenze von 0,8 mg/kg für alle Tetrazykline herangezogen.

Verwendete Chemikalien:

- Tetrazyklin-Hydrochlorid (Sigma, Art. Nr. T-3383)
- 4-Epi-Tetrazyklin-Hydrochlorid (Acros Organics, Art. Nr. 23312)
- Chlortetrazyklin-Hydrochlorid (Sigma, Art. Nr. C-4881)
- Epi-Chlortetrazyklin-Hydrochlorid (Acros Organics Lot AO 14963301)
- Oxytetrazyklin-Hydrochlorid (ICN Biomedicals Inc Lot-Nr. 5883C)
- Epi-Oxytetrazyklin (Acros Organics Lot AO 14381601)

Gradientenprogramm:

Zeit (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	100	0
7	63	37
12	63	37
13	100	0

Ende der Datenaufnahme nach 15 min Laufzeit.

Probenvorbereitung:

Nach Homogenisierung der Gülle mittels Ultra-Turrax (T 25 mit Dispergierstab S 25 N-25 F, IKA-Labortechnik, 20.000 U/min für 1 min) wurden 2 g der Gülle mit Citratpuffer (pH 4,8) auf 40 g aufgefüllt (Verdünnung 1:20). Dieses Gemisch wurde zentrifugiert (Minifuge T; Heraeus Sepatech, 10 min bei 6000 U/min) und der Überstand filtriert (Schleicher & Schüll, Ø 150 mm). Das Filtrat wurde in einen Mikrospin-Zentrifugenfilter (Fa. Roth, Volumen: < 2 ml) überführt und nochmals bei 4000 U/min für 20 min zentrifugiert. Die Lösung wurde direkt der HPLC zugeführt.

Die mittleren Wiederfindungsraten betrugen zwischen 62,5 % (OTC) und 109,7 % (CTC) (Tab. 7).

Tabelle 7: Wiederfindungsraten (%) für Tetrazyklin, Chlortetrazyklin und Oxytetrazyklin einschließlich der Epimere in Gülle bei externer Kalibration

Konzentration in der Probe	Tetrazyklin (%)	Chlortetrazyklin (%)	Oxytetrazyklin (%)
4,6 mg/kg	101,5	127,5	58,9
8,6 mg/kg	116,5	93,1	59,1
15,0 mg/kg	102,0	108,4	69,5
Mittelwert	106,7	109,7	62,5
STD	6,9	14,1	5,0

Sulfonamide

Gegenüber der o.g. Methode muss für die Sulfonamidbestimmung die Messwellenlänge des UV/VIS-Detektors auf 285 nm angepasst werden. Die Bestimmungsgrenze betrug 0,7 mg/kg.

Die mittleren Wiederfindungsraten betrugen 121,5 % (Sulfadiazin) und 102,4 % (Sulfamethazin) (Tab. 8).

Verwendete Chemikalien:

- Sulfamethazin Sodium Salt (Sigma, Art. Nr. S-5637)
- Sulfadiazin Sodium Salt (Sigma, Art. Nr. S-3549)

Tabelle 8: Wiederfindung (%) der Sulfonamide einschließlich der Epimere in Gülle bei externer Kalibration

Konzentration in der Probe	Sulfadiazin (%)	Sulfamethazin (%)
4,6 mg/kg	106,3	91,6
8,6 mg/kg	122,0	99,2
15,0 mg/kg	136,3	116,4
Mittelwert	121,5	102,4
STD	12,3	10,4

3.4.2 Ergebnisse

3.4.2.1 Screening anonymer Schweinegülleproben

Für das Screening auf TC, CTC und OTC sowie Sulfadiazin und Sulfamethazin standen insgesamt 176 anonyme Schweinegülleproben aus der Praxis zur Verfügung. Die Probenahme erfolgte durch die Landwirte selbst, weitere Informationen über die einzelnen Betriebe, aus denen die Gülleproben stammen, oder Angaben über einen Medikamenteneinsatz liegen nicht vor.

Die im Folgenden dargestellten Konzentrationen wurden um die jeweilige Wiederfindungsrate korrigiert und auf die Frischmasse bezogen.

Von 176 Proben waren 22 Gülleproben (12,5 %) mit keinem der 5 Wirkstoffe oberhalb der aufgeführten Bestimmungsgrenze belastet. In 2 Proben konnten alle 5 Wirkstoffe nachgewiesen werden. 65,3 % der Proben beinhalteten ein bis zwei Wirkstoffe, in 21 % der Proben ließen sich drei bis vier Wirkstoffe nachweisen.

Die Gülleproben variierten stark in ihrem Trockensubstanz- (0,7 – 16,8 %) und Stickstoffgehalt (0,15 – 1,05 %). Der durchschnittliche TS-Gehalt betrug 5 %, der mittlere N-Gehalt 0,48 %. Die überwiegende Zahl der Proben bewegte sich in einem Bereich von 3 bis 6 % TS-Gehalt (Tab. 9).

Der Anteil Proben mit positivem Antibiotikanachweis erhöhte sich ab einem TS-Gehalt von 3 % in der Gülle. Bei einem TS-Gehalt größer 6 bis 9 % waren beispielsweise 97,2 % der Proben mit mindestens einem Wirkstoff belastet. Dagegen konnte eine Wirkstoffbelastung bei nur 80 % der Proben nachgewiesen werden, wenn der TS-Gehalt unter 3 % lag.

Tabelle 9: Verteilung der Gülleproben in Bezug auf den Trockensubstanzgehalt

Klasse	TS < 3%	TS ≥ 3 %	TS ≥ 6 %	TS ≥ 9%	TS o. A.*
Anzahl Proben	50	68	36	20	2
Ø N-Gehalt (%)	0,29	0,48	0,58	0,78	0,42
Ø TS-Gehalt (%)	2,0	4,4	7,1	10,9	
Anzahl positive Proben	40	61	35	18	2
Anteil an Klasse (%)	80,0	89,7	97,2	90,0	100
Ø TC-Gehalt (mg/kg)**	1,8	9,5	22,5	9,4	
Ø SA-Gehalt (mg/kg)**	4,1	5,2	8,8	5,3	6,5

* ohne Angabe von TS-Gehalt

** Gesamtgehalt Tetrazykline bzw. Sulfonamide

Tetrazyklin

In 87 (49,4 %) von 176 untersuchten Schweinegülleproben konnte Tetrazyklin oberhalb der Bestimmungsgrenze von 0,8 mg/kg nachgewiesen werden. Die mittlere Konzentration betrug 9,7 mg/kg (0,9 - 43,1 mg/kg).

Oxytetrazyklin

Oxytetrazyklin lag in 9 (5,1 %) der 176 Schweinegülleproben vor (Ø 21,5; 1,6 - 136,2 mg/kg).

Chlortetrazyklin

In insgesamt 18 Proben (10,2 %) wurde Chlortetrazyklin nachgewiesen. Hier belief sich die mittlere Konzentration auf 6,2 mg/kg (1,1 - 25,7 mg/kg).

Sulfadiazin

In 86 (48,9 %) Proben wurde Sulfadiazin in einer mittleren Konzentration von 4,9 mg/kg nachgewiesen (0,7 - 35,3 mg/kg).

Sulfamethazin

Bei insgesamt 48,3 % der Proben verlief die Untersuchung auf Sulfamethazin positiv. Es wurde eine mittlere Konzentration von 7,0 mg/kg ermittelt bei einer Spanne von maximal 167,0 mg/kg und minimal 0,7 mg/kg.

3.4.2.2 Wirkstoffnachweis in Schweinegülle nach bekanntem Tierarzneimittleinsatz

Insgesamt 7 Schweinegülleproben standen für das Screening bei bekanntem Tierarzneimittleinsatz zur Verfügung. Diese Proben konnten in Zusammenarbeit mit der Landwirtschaftskammer Schleswig-Holstein akquiriert werden. Vom Probennehmer wurden der verabreichte Wirkstoff, der Ort der Probennahme und das Datum, an dem das verabreichte Medikament zuletzt gegeben wurde, dokumentiert. Über die Art der Probennahme, also ob die Gülle vor der Probennahme homogenisiert wurde, oder über länger zurückliegende Medikamentengaben lagen keine Angaben vor. Die unterschiedlichen Trockensubstanzgehalte der Proben von 1,9 % bis zu 13,2 % (Ø 5,9 %) deuten auf eine sehr variable Art der Probennahme hin. Die Stickstoffgehalte zwischen 0,30 % und 0,93 % (Ø 0,60 %) bestätigen diese Vermutung.

Tabelle 10 enthält eine Aufstellung der Proben einschließlich der eingesetzten Medikamente und der Befunde, letztere wiederum um die jeweilige Wiederfindung korrigiert.

Tabelle 10: Nachweis ausgewählter Tierarzneimittel* in von der LWK S-H zur Verfügung gestellten Gülleproben

Betrieb	eingesetztes Medikament/ Wirkstoff	Ende der Med-Gabe	Datum der Probenahme	Ort der Probenahme	gefundener Wirkstoff	Konzentration in mg/kg Gülle
1	Flubendazol, Neomycin, CTC 10	20.04.2002	03.05.2002	Stall	Tetrazyklin	28,9
					Chlortetrazyklin	203,3
2	Sulfadimidin (Sulfamethazin)	laufend	06.05.2002	Stall	Sulfamethazin	14,3
3	CTC, Colistin, Fendbendazol	laufend	24.04.2002	Stall	Tetrazyklin	1,7
					Chlortetrazyklin	21,5
4	CTC 100	02.05.2002	06.05.2002	Vorgrube	Tetrazyklin	5,1
5	CTC	13.04.2002	23.04.2002	Stall	Tetrazyklin	5,6
6	Trimethoprim, Klatoprim (Sulfadiazin), ASS (Acetylsalicylsäure)	07.05.2002	07.05.2002	Stall	Tetrazyklin	1,5
					Chlortetrazyklin	44,1
					Sulfamethazin	16,8
					Sulfadiazin	35,2
7	Piperacin, Hefromed (Sulfadimidin)	14.05.2002	15.05.2002	Stall	Sulfamethazin	5,8

* Tetrazyklin, Oxytetrazyklin, Chlortetrazyklin, Sulfadiazin, Sulfamethazin (Sulfadimidin) (inkl. Hauptmetabolite, außer Sulfadiazin)

Für alle untersuchten Betriebe galt, dass der Einsatz von Tetrazyklin für den aktuellen Durchgang nicht angegeben worden war. Dennoch wurde in 5 Betrieben Tetrazyklin in Konzentrationen von 1,5 bis 28,9 mg/kg nachgewiesen. Dies lässt sich entweder auf die ausgeprägte Persistenz des Tetrazyklins in Gülle oder einen nicht deklarierten Einsatz des Wirkstoffs zurückführen. Der Nachweis von Tetrazyklin in Betrieben, für die der Einsatz von Chlortetrazyklin angegeben worden war (Betriebe 4 und 5), lässt auf Fehler in der Dokumentation schließen, da es für einen Abbau von Chlortetrazyklin zu Tetrazyklin in der Literatur keinerlei Hinweise gibt. Zusätzlich muss in Betracht gezogen werden, dass in Betrieb 4 die Gülleprobe aus der Vorgrube entnommen wurde und das verabreichte Chlortetrazyklin zum Zeitpunkt der Probennahme die Vorgrube möglicherweise noch nicht erreicht hatte.

In Bezug auf die untersuchten Sulfonamide treten weniger Unstimmigkeiten auf. Nur in einem Fall, Betrieb 6, wurde in Kombination mit Trimethoprim ein sulfadiazinhaltiges Präparat verabreicht. Neben Sulfadiazin konnte allerdings auch Sulfamethazin nachgewiesen werden. In allen anderen Fällen entsprachen die Analyseergebnisse zumindest qualitativ den Angaben.

4 Teilvorhaben 2: Modellversuche zur Mobilität von Tetrazyklin und Sulfadiazin in Böden

4.1 Modifikation der HPLC-Nachweismethode für Tetrazykline in Sickerwasser

Neben Tetrazyklin-HCL einschließlich des Metaboliten 4-Epi-Tetrazyklin-HCL wurde Chlortetrazyklin/Epi-Chlortetrazyklin in die Nachweismethode aufgenommen. Im 2. Versuchsjahr (2002) wurde zusätzlich Sulfadiazin einbezogen.

Auch Sickerwasser aus Böden stellt aufgrund verschiedenster anorganischer und organischer Bestandteile eine komplizierte Matrix dar, da mit einer starken Bindung vor allem der Tetrazykline, aber auch der Sulfonamide an diese unterschiedlichen Komponenten gerechnet werden muss (Sithole und Guy 1987; Holten Lützhøft et al. 2000; Tolls 2001). Aufgrund der geringen zu erwartenden Konzentrationen der Wirkstoffe im Sickerwasser sind beim HPLC-gestützten Nachweis viele Aufbereitungsschritte notwendig, die zu Wirkstoffverlusten führen können. Aus diesem Grund wurde ein geeigneter interner Standard eingeführt.

Sulfadiazin wird bei der Passage durch das Tier teilweise metabolisiert; wichtigster Metabolit ist das N4-Acetyl-Sulfadiazin. Diese Substanz ist im Fachhandel nicht als Reinsubstanz erhältlich, so dass keine Quantifizierung möglich ist.

4.1.1 Tetrazykline

Bis auf die unten aufgeführten Änderungen gelten für den Nachweis von Tetrazyklinen in Sickerwasser die HPLC-Einstellungen aus Kapitel 3.1. Die

Nachweisgrenze für Tetrazyklin und Chlortetrazyklin liegt bei 1 µg/l im Ausgangsmaterial.

Verwendete Chemikalien:

- Chlortetrazyklin-HCL (Sigma, Art. Nr. C-4881)
- Epi-Chlortetrazyklin (Arcos Organics Lot AO14963301)
- Doxyzyklin-HCL (Sigma, Art. Nr. D-9891)
- Methanol
- Trichloressigsäure

Gradientenprogramm:

Zeit (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0,0	100,0	0,0
7,0	75,0	25,0
7,5	75,0	25,0
8,0	70,0	30,0
11,5	63,0	37,0
13,0	63,0	37,0
13,5	100,0	0,0

Ende der Datenaufnahme nach 15 min Laufzeit.

Probenvorbereitung:

Die Sickerwasserproben (die Lagerung bis zur Analyse erfolgte bei -18 °C) wurden aufgetaut und geschüttelt. Die Probe (100 ml) wurde mit Zitronensäure-Zitrat-Puffer im Verhältnis 1:1 versetzt. Als interner Standard wurde Doxyzyklin-HCL, ein in Deutschland für den veterinärmedizinischen Gebrauch nicht zugelassenes Antibiotikum aus der Gruppe der Tetrazykline, verwendet. Nach Filtration (Faltenfilter, Schleicher & Schüll, Ø 150 mm) erfolgte eine Anreicherung mittels Festphasenextraktion an Polystyrol-Divinylbenzol Adsorberharz. Zu diesem Zweck wurden Festphasenkartuschen (Macherey &

Nagel, LV, Chromabond HR-P, Art. Nr. 732108) mit 2 ml Methanol und 2 ml destilliertem Wasser konditioniert. Dann erfolgte die Probenaufgabe mit einer maximalen Durchflussgeschwindigkeit von 4 ml/min. Nach dem Waschschrift (2 x 2 ml destilliertes Wasser) trocknete die Kartusche 10 min, um Lösungsmittelunterschiede zu vermeiden. Es folgte die Elution mit 2 x 1 ml 0,5 % Trichloressigsäure in Methanol. Dies ergab einen Anreicherungsfaktor von 1:50. Die so gewonnene Lösung konnte direkt der HPLC-Messung zugeführt werden. Bei Kalibration über den internen Standard ergab sich eine mittlere Wiederfindung für Tetrazyklin von 121,3 % und für Chlortetrazyklin von 122,1 % (Tab. 11).

Tabelle 11: Wiederfindung (%) der Tetrazykline einschließlich der Epimere in Sickerwasser bei interner Kalibration

Konzentration in der Probe	Tetrazyklin (%)	Chlortetrazyklin (%)
1 µg/l	115,8	115,4
10 µg/l	119,7	122,9
40 µg/l	128,5	128,1
Mittelwert	121,3	122,1
STD	5,3	5,2

4.1.2 Sulfadiazin

Für den Nachweis von Sulfadiazin waren auf Basis der unter 4.1.1 beschriebenen Methode lediglich einige substanzspezifische Modifikationen in der Probenvorbereitung sowie in der Detektion erforderlich. Die Nachweisgrenze für Sulfadiazin liegt bei 3 µg/l.

Verwendete Chemikalien:

- Zitronensäure-Zitrat-Puffer (pH 4,8), 0,1 M
- Sulfadiazin Sodium Salt (Sigma, Art. Nr. S-3549)
- Sulfaphenazol (Sigma, Art. Nr. S-0758)
- Methanol

HPLC-Konfiguration:

- UV-VIS-Detektor (Messwellenlänge 285 nm)

Gradientenprogramm:

Zeit (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0,0	100,0	0,0
8,0	63,0	37,0
13,0	63,0	37,0
16,0	100,0	0,0

Ende der Datenaufnahme nach 17 min Laufzeit.

Probenvorbereitung:

Unter Verwendung eines externen Standards betrug die mittlere Wiederfindung lediglich ca. 56 %. Eine vergleichbar geringe Wiederfindungsrate wurde auch von Haller et al. (2002) beschrieben. Daher erfolgte auch beim Nachweis von Sulfadiazin der Einsatz von Sulfaphenazol als interner Standard, Die Elution nach Festphasenextraktion erfolgte abweichend von 4.1.1 mit 2 x 1 ml Methanol.

Die mittlere Wiederfindungsrate betrug 95,9 % (Tab. 12).

Tabelle 12: Wiederfindung (%) von Sulfadiazin in Sickerwasser bei interner Kalibration

Probe	0,01 mg/l	0,02 mg/l
1	105,7	71,0
2	105,7	108,7
3	90,1	94,6
Mittelwert	100,3	91,4
STD	7,2	15,6

4.2 Mobilität von Tetrazyklin und Sulfadiazin in verschiedenen Böden im Krumenlysimeter

Die Mobilität von Tetrazyklin und Sulfadiazin in verschiedenen Böden wurde in Zusammenarbeit mit der Landwirtschaftskammer Weser-Ems in Oldenburg unter Nutzung der dort vorhandenen Kick-Brauckmann-Gefäße untersucht.

4.2.1 Versuchsaufbau

Je 16 Kick-Brauckmann-Gefäße (Ø 22 cm, Krumenhöhe 24 cm) wurden mit zwei für die Region Weser-Ems typischen Böden (V1: humoser Sand, 7,5 kg/Gefäß; V2: lehmiger Schluff, 8 kg/Gefäß) sowie einem industriell hergestellten Torfgemisch (V3, sog. Null- oder Einheitserde, 3 kg/Gefäß) befüllt (Abb. 16). Nullerde besteht zu 70 % aus Weißtorf, zeichnet sich also durch einen hohen Strukturanteil aus (weitere Bestandteile sind Ton und Kalk) und wurde mangels einer geeigneten Moorbodenfläche herangezogen.

Die Böden waren wie folgt gekennzeichnet (Tab. 13):

Tabelle 13: Kenndaten der verwendeten Böden im Gefäß

	V1	V2	V3
Bodenart	humoser Sand	lehmiger Schluff	Nullerde
Nutzung	Acker	Acker	Gärtnerdorf
pH-Wert	5,0	5,5	5,9
Calcium (mg/100g)	100	100	1050
Humus (%)	6,0	3,1	30,3
Ton (%)	1,3	6,6	k.A.
Schluff (%)	13,2	63,2	-
KAK (mval/100g)	21,3	12,6	84,8



Abbildung 16: Befüllte Gefäße vor der Beaufschlagung mit Gülle

Die Gefäße wurden ohne Bewuchs bei etwa 50 % Feldkapazität gehalten. Diese Bedingung konnte durch die Ausnutzung der Saugspannung durch Verdunstung gewährleistet werden. Dazu wurden Glasfaserstränge in das Bodenmaterial eingearbeitet, die in Wasserbehältern endeten. Aufgrund der

Saugspannung wurde Wasser über die Glasfaserstränge in den Boden gesogen, der so feucht blieb. Es handelt sich bei der Glasfaser um ein inertes Material, so dass keine Wechselwirkungen mit den beiden Antibiotika zu erwarten waren. Labortests mit Tetrazyklin und Sulfadiazin bestätigten, dass auch bei längerer Einwirkzeit keine Anlagerung der Wirkstoffe an die Glasfasern auftritt.

Insgesamt 18 der Gefäße (6 Gefäße je Boden) wurden mit jeweils 200 ml tetrazyklinhaltiger Gülle mit einer Gesamt-TC-Konzentration von 40 mg/kg dotiert (8 mg TC/Gefäß). 18 Gefäße erhielten jeweils 200 ml sulfadiazinhaltige Gülle mit einer Gesamt-SD-Konzentration von 40 mg/kg (8 mg SD/Gefäß). Die Güllemenge von 200 ml je Gefäß entsprach einer Menge von 43 m³ je Hektar bzw. 179 kg N/ha. Die restlichen Gefäße dienten als Kontrollen. Bei der Aufbringung der Gülle wurde ein Einarbeiten des Wirtschaftsdüngers nachgeahmt, indem mit einem Pikierstab je Gefäß drei ca. 1,5 cm breite Furchen gezogen wurden. Die Gülle wurde in die Furchen gegeben und diese mit dem aufgeworfenen Bodenmaterial bedeckt. Auf diese Weise wurde auch sichergestellt, dass keine Gülle an den Gefäßrand gelangen und dort möglicherweise am Kunststoff adsorbieren konnte.

Die mögliche Auswaschung der Wirkstoffe wurde mittels Starkregensimulation zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht (s. nächsten Abschnitt), um möglichen Abbau- oder Bindungsvorgängen im Boden Rechnung zu tragen.

Starkregensimulation:

48 Stunden nach Versuchsansatz wurden die Hälfte der mit Tetrazyklin und Sulfadiazin dotierten Gefäße (3 je Bodenart und Behandlung) sowie 6 Kontrollgefäße mit 1,52 l Wasser je Gefäß über eine Zeitspanne von 1,5 h beregnet. Damit wurde ein Starkregenereignis von 40 l/m² simuliert.

10 Wochen nach Versuchsansatz wurden die restlichen 24 Gefäße in der gleichen Art beregnet (Tab. 14).

Tabelle 14: Versuchsübersicht zur Mobilität von Tetrazyklin und Sulfadiazin in den Gefäßen (V = Variante; TC = Tetrazyklin; SD = Sulfadiazin)

Bodenart	Beregnung nach 48 h		Beregnung nach 10 Wochen	
	Probe	Dotierung	Probe	Dotierung
humoser Sand = V1	V1/1	Kontrolle	V1/9	Kontrolle
	V1/2-V1/4	TC	V1/10-V1/12	TC
	V1/5	Kontrolle	V1/13	Kontrolle
	V1/6-V1/8	SD	V1/14-V1/16	SD
lehmiger Schluff = V2	V2/1	Kontrolle	V2/9	Kontrolle
	V2/2-V2/4	TC	V2/10-V2/12	TC
	V2/5	Kontrolle	V2/13	Kontrolle
	V2/6-V2/8	SD	V2/14-V2/16	SD
Nullerde/Torf = V3	V3/1	Kontrolle	V3/9	Kontrolle
	V3/2-V3/4	TC	V3/10-V3/12	TC
	V3/5	Kontrolle	V3/13	Kontrolle
	V3/6-V3	SD	V3/14-V3/16	SD

Probennahme:

Das durch die Beregnung entstandene Sickerwasser je Gefäß wurde in 4 Fraktionen zu je 100 ml aufgefangen (Probe I-IV) (Abb. 17) und bis zur Analyse bei -18 °C gelagert.



Abbildung 17: Fraktionierte Beprobung des Sickerwassers

Zusätzlich erfolgte jeweils nach der Beregnung die Entnahme von Proben des Ober- und Unterbodens (Oberboden 0-12 cm, Unterboden 12-24 cm; je Gefäß mehrere Einstiche). Bei den mit Sulfadiazin dotierten Gefäßen wurden nur die Proben aus dem Oberboden analysiert, da die Verlagerbarkeit des Sulfadiazins als sehr gering eingestuft wurde.

Die Analyse der Proben erfolgte in der Zentrumsabteilung für Lebensmitteltoxikologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

4.2.2 Ergebnisse

4.2.2.1 Starkregensimulation 48 h nach Versuchsansatz

Sickerwasser

Bei der Analyse dieser Proben stand nur ein Probenvolumen von 50 ml zur Verfügung. Daraus ergab sich ein Anreicherungsfaktor von 1:25 und eine Anhebung der Bestimmungsgrenze auf 2 µg/l bei Tetrazyklin und 6 µg/l bei Sulfadiazin. In den unter humosem Sandboden (V1) sowie lehmigem Schluff

(V2) gewonnenen Wasserproben konnten weder Tetrazyklin noch Sulfadiazin oberhalb der Bestimmungsgrenze von 2 bzw. 6 µg/l nachgewiesen werden. Dagegen wies das Sickerwasser unter der Nullerde (V3) bei zwei Gefäßen Tetrazyklin in Konzentrationen zwischen 2 und 10 µg/l auf (Abb. 18); Sulfadiazin war ebenfalls nicht nachweisbar. Die in Tabelle 15 aufgelisteten Ergebnisse (um die Wiederfindung korrigiert) wurden durch Untersuchungen in einem Referenzlabor (TiHo Hannover) bestätigt.

Tabelle 15: Gehalte an TC und SD (µg/l) im Sickerwasser bei Beregnung nach 48h (V1 = humoser Sandboden; V2 = lehmiger Schluff; V3 = Nullerde; I-IV = Fraktionen)

Varianten	I		II		III		IV	
	TC	SD	TC	SD	TC	SD	TC	SD
Humoser Sand								
V1/1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
V1/2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
V1/3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
V1/4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Lehmiger Schluff								
V2/1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
V2/2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
V2/3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
V2/4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Nullerde/ Torf								
V3/1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
V3/2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
V3/3	3,3	n.n.	8,2	n.n.	1,6	n.n.	2,5	n.n.
V3/4	4,9	n.n.	3,3	n.n.	4,9	n.n.	4,1	n.n.

kursiv: Wert < Bestimmungsgrenze 2 µg/l, durch Referenzlabor bestätigt

n.n.: nicht nachweisbar

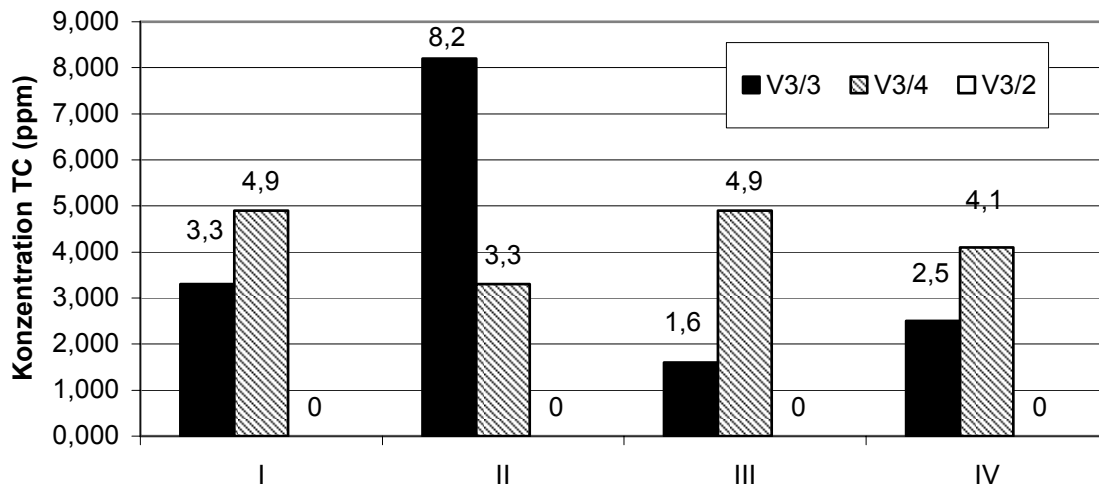


Abbildung 18: TC-Konzentration in den Sickerwasserfraktionen I bis IV der Varianten V3 (Nullerde/Torf), Starkregenereignis 48 h nach Begüllung

Boden

Die Analyse der Bodenproben der Kontrollvarianten V1/5 (humoser Sand), V2/9 (lehmiger Schluff) und V3/5 (Nullerde/Torf), also der weder mit Gülle noch mit Wirkstoff behandelten Gefäße, ergab, dass der Boden keine Tetrazyklin- und Sulfadiazinkonzentrationen oberhalb einer Nachweisgrenze von 1 µg/kg Boden enthielt (Nachweis durch Referenzlabor).

Abbildung 19 zeigt die TC-Konzentrationen im Ober- und Unterboden der Gefäße.

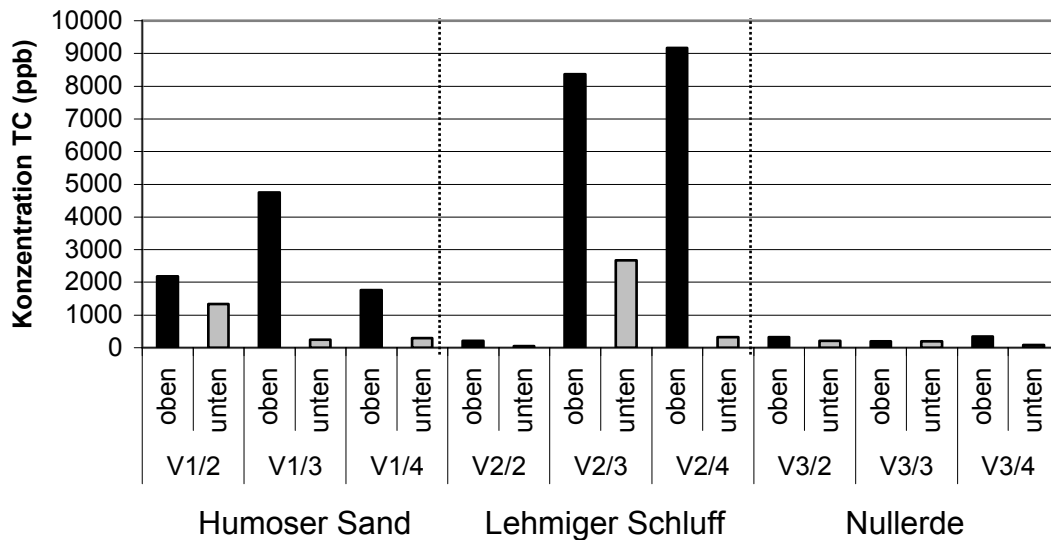


Abbildung 19: TC-Konzentration im Ober- und Unterboden der Versuchsböden V1, V2 und V3; Starkregenereignis nach 48h

Die in diesem Versuch verwendeten Böden sind nach Starkregensimulation nach 48 Stunden durch starke Unterschiede in den TC-Gehalten gekennzeichnet. Während Nullerde die geringsten Werte mit durchschnittlich 287 µg/kg im Ober- und 160 µg/kg im Unterboden aufwies, wurden die höchsten Konzentrationen beim lehmigen Schluff mit im Mittel 5921 µg/kg im Ober- und 1018 µg/kg im Unterboden gefunden; der humose Sandboden nahm eine Mittelstellung ein (Ø Oberboden: 2898 µg/kg; Ø Unterboden: 621 µg/kg). Aber auch innerhalb der Bodenvarianten sind hohe Konzentrationsunterschiede zu verzeichnen. Am stärksten ist dies beim lehmigen Schluff der Fall; hier reicht im Oberboden die Spanne von 214 µg/kg (V2/2) bis 9172 µg/kg (V2/4). Auffällig ist, dass die nachweisbaren TC-Konzentrationen sowohl im Ober- als auch im Unterboden bei der Nullerde weitaus geringer sind als bei den beiden anderen verwendeten Böden. Die hohen Einzelwerte im Oberboden bei lehmigem Schluff sind möglicherweise auf Vermischung mit Gülle bei der Probenentnahme zurückzuführen.

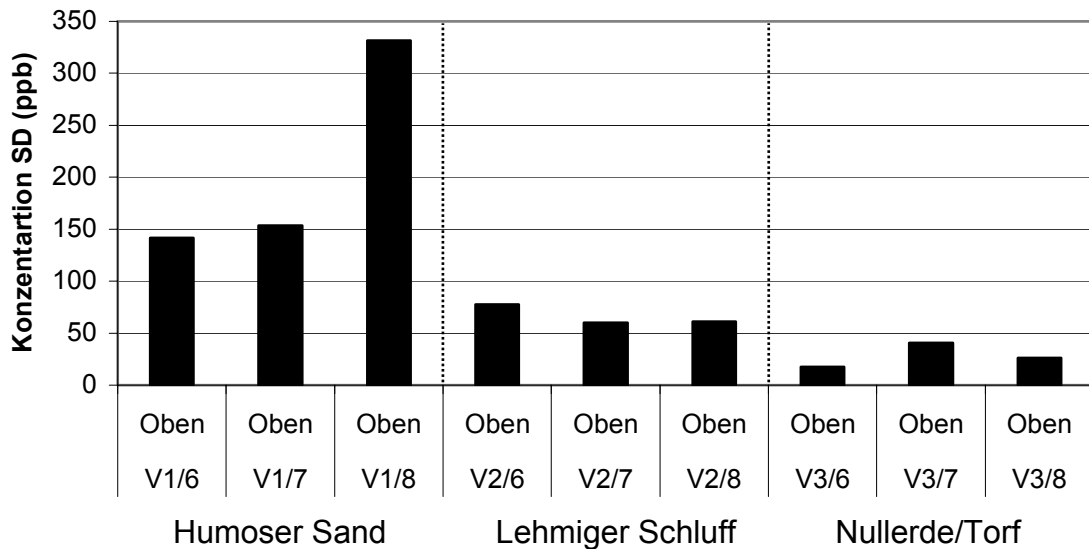


Abbildung 20: SD-Konzentration im Oberboden der Versuchsböden V1, V2 und V3; Starkregenereignis nach 48h

Sulfadiazin wurde in Konzentrationen von 17,6 µg/kg (Nullerde/Torf) bis über 330 µg/kg (humoser Sand) nachgewiesen (Abb. 20).

4.2.2.2 Starkregensimulation nach 10 Wochen

Sickerwasser

10 Wochen nach Versuchsansatz wurde wie oben beschrieben bei den verbleibenden 24 Gefäßen eine Beregnung durchgeführt und das Sickerwasser fraktioniert aufgefangen. In allen untersuchten Sickerwasserfraktionen konnten weder Tetrazyklin- noch Sulfadiazinkonzentrationen oberhalb der Bestimmungsgrenze von 2 bzw. 6 µg/l nachgewiesen werden.

Boden

Im Vergleich zur Beregnung 48h nach Versuchsansatz war nach 10 Wochen ein deutlicher Rückgang in den Bodengehalten zu verzeichnen. So wies der humose Sand zum Beispiel mit durchschnittlich 553 µg/kg TC ca. 20% der früher ermittelten Konzentration auf.

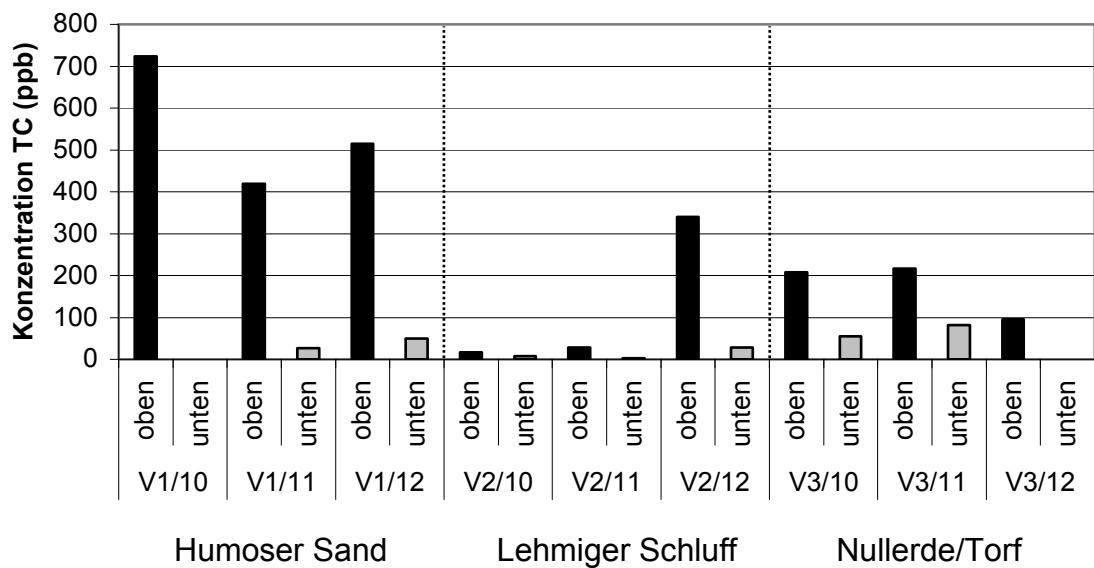


Abbildung 21: TC-Konzentrationen im Ober- und Unterboden der Versuchsböden V1, V2 und V3; Starkregenereignis nach 10 Wochen

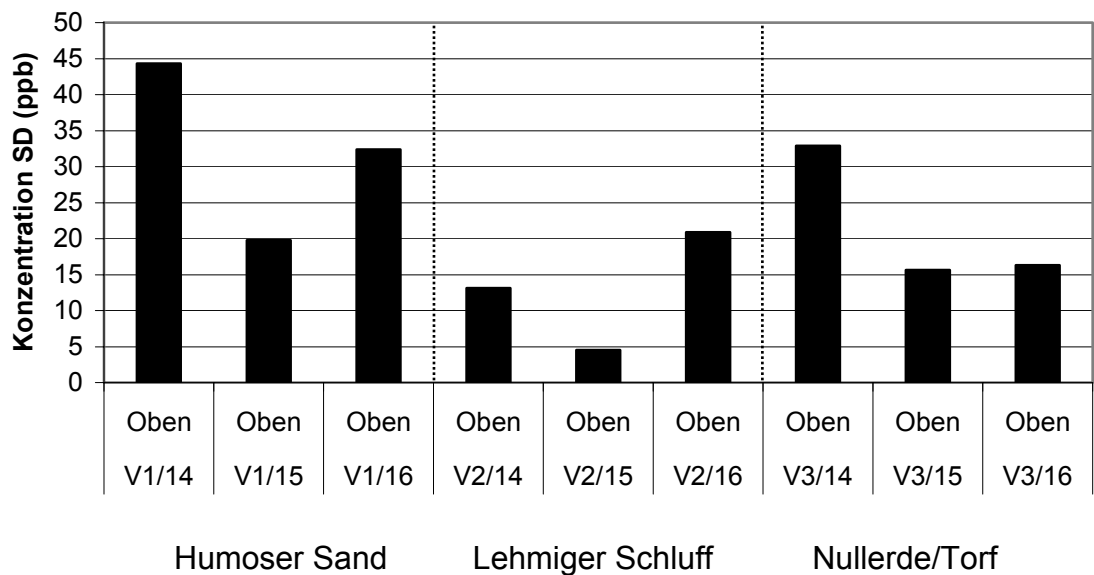


Abbildung 22: SD-Konzentrationen im Oberboden der Versuchsböden V1, V2 und V3; Starkregenereignis nach 10 Wochen

Dieser Effekt war für Tetrazyklin ausgeprägter als für Sulfadiazin, das bereits nach 48h in sehr viel geringerer Konzentration nachgewiesen werden konnte. 48 h nach Versuchsansatz machte die Konzentration von Sulfadiazin im Oberboden durchschnittlich nur 6 bis 12 % des Tetrazyklingehaltes (Abb. 21; Abb. 22) aus. Tetrazyklin zeigte weiterhin starke Schwankungen in der Konzentration im Boden, besonders im Oberboden (lehmiger Schluff: von 17,0 µg/kg bis zu 339,7 µg/kg), was auch nach 10 Wochen noch mit Gülleresten in der Bodenprobe erklärt werden könnte. Es waren weiterhin höhere TC-Gehalte im Ober- als im Unterboden zu verzeichnen; das Verhältnis der Konzentrationen in Ober- und Unterboden blieb nahezu gleich.

4.3 Mobilität von Tetrazyklin und Sulfadiazin im Lysimeter

Zur Untersuchung der Mobilität von Tetrazyklin und Sulfadiazin im Boden stand eine Lysimeteranlage auf dem Gelände der LUFA Oldenburg der Landwirtschaftskammer Weser-Ems zur Verfügung.

4.3.1 Versuchsaufbau

Die hier bearbeitete Fragestellung konnte in eine seit mehreren Jahren durchgeführte Versuchsreihe zur Frage der N-Auswaschung bei unterschiedlichen Gülle-N-Gaben (0, 80, 120, 160 bzw. 240 kg N) integriert werden. Dafür standen im Zeitraum zwischen Frühjahr 2001 und Oktober 2002 insgesamt 20 Lysimeter zur Verfügung. Die Lysimeter (Tiefe: 1,50 m; Ø 1 m) wurden bereits 1988 mit einem für die Region typischen humosen Sand befüllt. Zusätzlich konnten in 2001 vier weitere Lysimeter, seit 1996 mit einem humosen Sand anderer Herkunft befüllt, genutzt werden (Tab. 16).

Tabelle 16: Kenndaten der in den Lysimetern verwendeten Böden, Krume - Unterboden

	humoser Sandboden I	humoser Sandboden II
angelegt seit	1988	1996
Nutzung	Acker	Acker
pH-Wert	5,2 ¹ - 5,0 ²	5,1 ¹ - 5,0 ²
Humus (%)	2,4 ¹ - 0,5 ²	3,6 ¹ - 4,6 ²
K ₂ O (mg/100 g)	15 ¹ - 6 ²	32 ¹ - 24 ²
Mg (mg/100 g)	3 ¹ - 1 ²	11 ¹ - 7 ²

¹ Gehalt im Oberboden² Gehalt im Unterboden

Nachweislich wirkstofffreie Schweinegülle (N-Gehalt 0,42 %) wurde im ersten Versuchsjahr (2001) mit 15 mg/kg Tetrazyklin dotiert. Die Lysimeter wurden entweder mit Mais oder Winterroggen bestellt (Abb. 23). Anhand der N-Düngungsstufen 80, 160 und 240 kg N/ha wurden über unterschiedliche Güllegaben unterschiedliche Tetrazyklinmengen je Lysimeter (22,5 bis 67,2 mg/Lysimeter) aufgebracht (Tab. 17). Bei Mais wurde die Gülle vor der Aussaat ca. 3-4 cm tief in den Oberboden eingearbeitet, bei Winterroggen erfolgte im Frühjahr eine oberflächliche Ausbringung in den Bestand.

4 zusätzliche Lysimeter der N-Stufe 200 kg N/ha mit humosem Sandboden II erhielt mit 18 bzw. 36 mg/kg dotierte Schweinegülle (entsprechend 67,3 bzw. 134,6 mg Tetrazyklin).

Je Wirkstoffmenge und Fruchtart wurden 2 Lysimeter eingesetzt. Weiterhin standen als Kontrolle jeweils 2 mit wirkstofffreier Gülle gedüngte Lysimeter (120 kg N-Stufe) sowie 2 Lysimeter, die keine Gülle erhielten, zur Verfügung.



Abbildung 23: Mit Winterroggen bestellte Lysimeter

Im 2. Versuchsjahr (2002) erfolgte mit Ausnahme der 4 zusätzlichen Lysimeter mit humosem Sandboden II eine Wiederholung. Zusätzlich wurde Sulfadiazin als weiteres Tierarzneimittel zugesetzt. Aufgrund eines geringeren N-Gehalts der auszubringenden Gülle wurde 2002 jeweils eine Konzentration von 12 mg/kg TC bzw. SD eingestellt.

Tabelle 17: Übersicht zur Versuchsanordnung bei der Untersuchung der Mobilität von Tetrazyklin und Sulfadiazin im Lysimeter (TC = Tetrazyklin; SD = Sulfadiazin)

	Lysimeter- Nr.	N-Stufe (kg/ha)	Güllemenge (l)		TC-Menge (mg/Lys.)		SD-Menge (mg/Lys.)¹
			2001	2002	2001	2002	2002
M A I S	1 + 25	0	0	0	0	0	0
	2 + 26	80	1,50	1,85	22,5	22,2	22,2
	3 + 27	120	2,24	2,77	0	0	0
	4 + 28	160	3,00	3,69	45,0	44,3	44,3
	13 + 35	240	4,48	5,54	67,2	66,5	66,5
	49 + 61*	200	3,74	-	67,3	-	-
	58 + 65*	200	3,74	-	134,6	-	-
			2001	2002	2001	2002	2002
R O G G E N	5 + 29	0	0	0	0	0	0
	6 + 30	80	1,50	1,85	22,5	22,2	22,2
	7 + 31	120	2,24	2,77	0	0	0
	8 + 32	160	3,0	3,69	45,0	44,3	44,3
	15 + 33	240	4,48	5,54	67,2	66,5	66,5

* Bodenart: humoser Sand II (4 zusätzliche Lysimeter)

¹ in 2001 kein Sulfadiazin eingesetzt

Probenahme:

Das Sickerwasser aus den Lysimetern wurde in lichtgeschützten Behältern aufgefangen, da Tetrazyklin bei Lichteinwirkung instabil ist (Kühne et al. 2001). Wöchentlich wurde die angefallene Gesamt-Sickerwassermenge erfasst und eine Probe des Sickerwassers (ca. 500 ml) entnommen. Die Wasserproben wurden umgehend eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -18 °C gelagert. Im ersten Versuchsjahr (2001) wurde bei Roggen ab der 13. Kalenderwoche (KW) mit der Beprobung begonnen, bei Mais ab der 19. KW

(erste Sickerwasserbildung nach Gülleaufbringung). In der 50. KW 2001 endete die Sickerwasserbildung aufgrund des einsetzenden Winters. Im 2. Versuchsjahr 2002 wurde bei Roggen ab der 16. KW beprobt, bei Mais erfolgte die Probenahme ab der 21. KW; die letzte Probennahme fand in der 40. KW statt.

Zusätzlich zu den Wasserproben wurden im Frühjahr und im Herbst von ausgewählten Lysimetern Bodenproben entnommen und auf Tetrazyklin bzw. Sulfadiazin untersucht. Die Probenahmetiefe betrug 20 cm.

4.3.2 Ergebnisse

4.3.2.1 Tetrazyklin

Sickerwasser

Insgesamt fielen im Probennahmezeitraum 2001 unter Mais 299 und unter Roggen 216 Proben an. Die Analyse der Wasserproben erfolgte zunächst chronologisch. Die Wasserproben ausgewählter Lysimeter (positiver TC-Nachweis; TC-Gaben > 40 mg TC/Lysimeter) wurden bis einschließlich der 50. KW analysiert. Bei den restlichen Lysimetern erfolgte die Sickerwasseruntersuchung lediglich bis zur 37. KW. Dieses Verfahren bedeutete, dass 82 % der Wasserproben unter Mais und 67 % der Wasserproben unter Roggen analysiert wurden.

In den analysierten Sickerwasserproben unter Roggen (n=145) konnte kein Tetrazyklin oberhalb der Bestimmungsgrenze von 1 µg/l nachgewiesen werden. Bei den analysierten Sickerwässern unter Mais (n=245) wurde in 4 Proben eine Tetrazyklinkonzentration oberhalb 1 µg/l in einer Größenordnung von 1 bis 3 µg/l ermittelt. Diese 4 Befunde traten ausschließlich in den ersten 4 Wochen nach Gülleapplikation auf (Tab. 18).

Tabelle 18: Tetrazyklin-Gehalte ($\mu\text{g/l}$) im Sickerwasser unter Mais, 2001 (I: humoser Sandboden I; II: humoser Sandboden II)

Lysimeter- Nr.		TC-Menge (mg/Lys.)	1. Woche (19. KW)	2. Woche (20. KW)	3. Woche (21. KW)	4. Woche (22. KW)
1	I	0,0	-	-	-	-
25	I	0,0	-	-	-	-
2	I	22,5	1,3	-	-	-
26	I	22,5	-	-	-	-
3	I	0,0	-	-	-	-
27	I	0,0	-	-	-	-
4	I	45,0	-	-	-	-
28	I	45,0	-	-	-	-
13	I	67,2	-	-	-	3,1
35	I	67,2	-	-	-	-
49	I	67,3	-	-	-	-
61	I	67,3	-	-	-	-
58	II	134,6	-	-	0,9¹	-
65	II	134,6	-	-	1,2	-

- = kein Befund > 1 $\mu\text{g/l}$

¹ Wert < 1 $\mu\text{g/l}$, aber durch Referenzmessung bestätigt

Die Abbildungen 24 - 27 zeigen den Sickerwasserverlauf im Jahr 2001 der 4 Lysimeter, die die positiven TC-Befunde aufwiesen. Es fällt auf, dass die TC-Befunde jeweils in Wochen mit nur geringem Sickerwasseranfall auftraten. Lysimeter 2 und 13 sind mit humosem Sand I befüllt, Lysimeter 58 und 65 dagegen mit humosem Sand II.

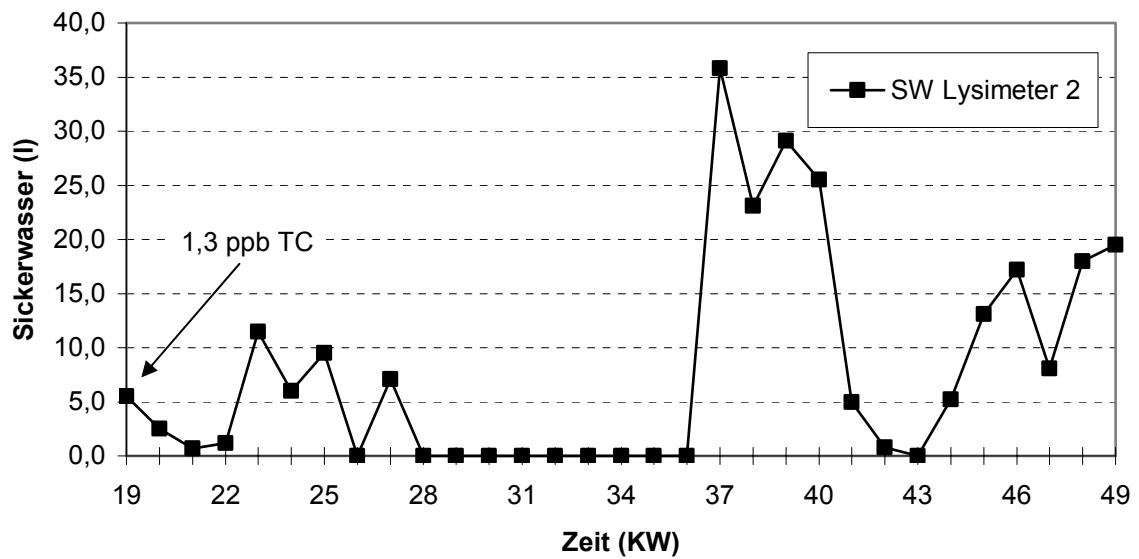


Abbildung 24: Sickerwasseranfall unter Lysimeter 2 (humoser Sand I), Mais, Durchgang 2001; TC-Befund 19. KW

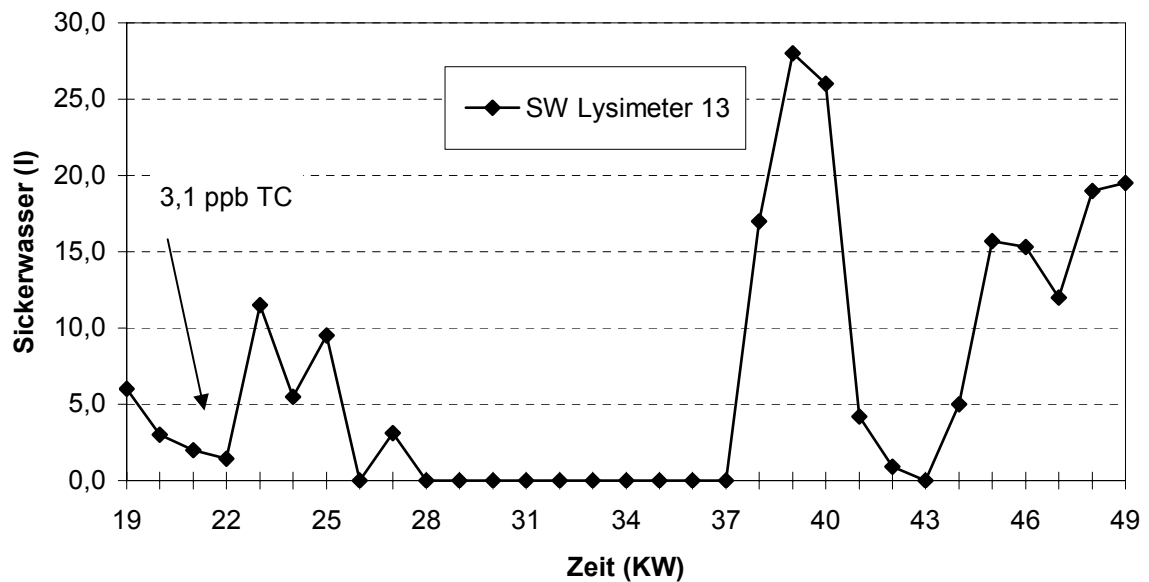


Abbildung 25: Sickerwasseranfall unter Lysimeter 13 (humoser Sand I), Mais, Durchgang 2001, TC-Befund 22. KW

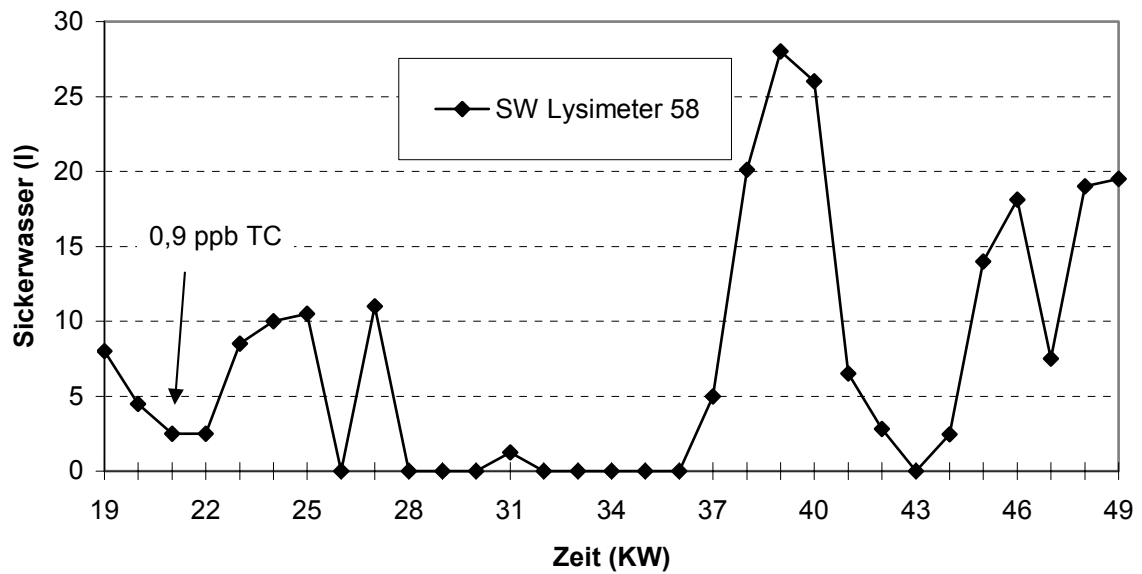


Abbildung 26: Sickerwasseranfall unter Lysimeter 58 (humoser Sand II), Mais, Durchgang 2001, TC-Befund 21. KW

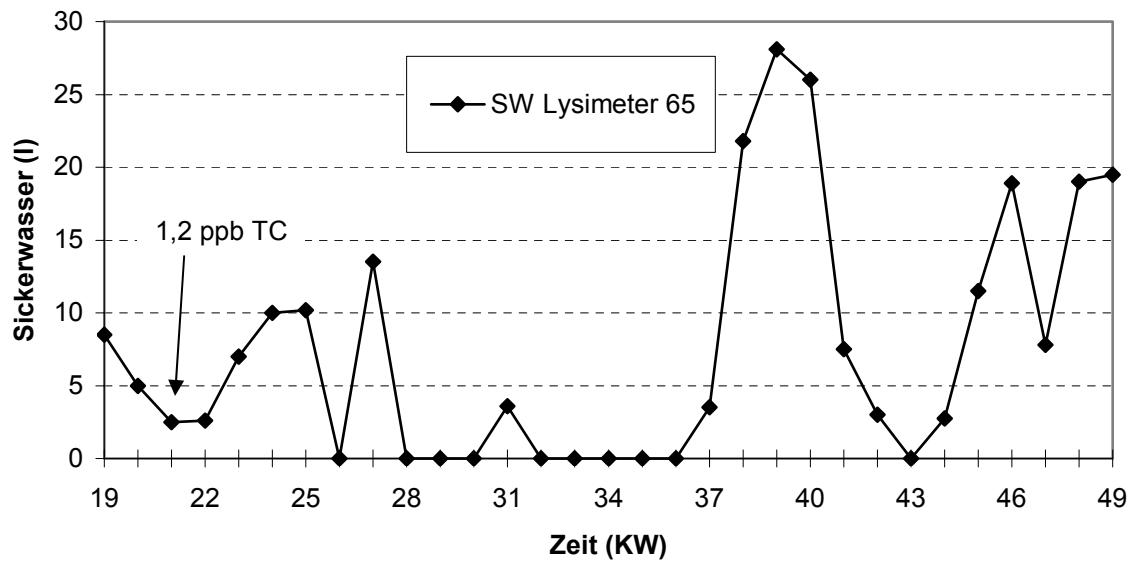


Abbildung 27: Sickerwasseranfall unter Lysimeter 65 (humoser Sand II), Mais, Durchgang 2001, TC-Befund 21. KW

Im zweiten Versuchsjahr erfolgte die Probennahme aufgrund der Erfahrungen aus dem Vorjahr bis zur 40. KW (Maisernte). So fielen unter Mais 65 und unter Roggen 91 Wasserproben an, die sämtlich auf Tetrazyklin untersucht wurden. In keinem Fall konnte TC im Sickerwasser in einer Konzentration oberhalb 1 µg/l nachgewiesen werden.

Boden

Bodenproben der Nullvarianten bestätigten, dass die Lysimeter vor der TC-Applikation kein Tetrazyklin enthielten. Dagegen konnte als Nebenfund Chlortetrazyklin in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen werden, was auf die Verwendung CTC-haltiger Gülle in den Vorjahren schließen lässt. Trotz dieser CTC-Belastung wurde jedoch in keinem Fall CTC im Sickerwasser nachgewiesen.

Beim Roggen stellen sich die Ergebnisse der Bodenuntersuchungen folgendermaßen dar (Abb. 28):

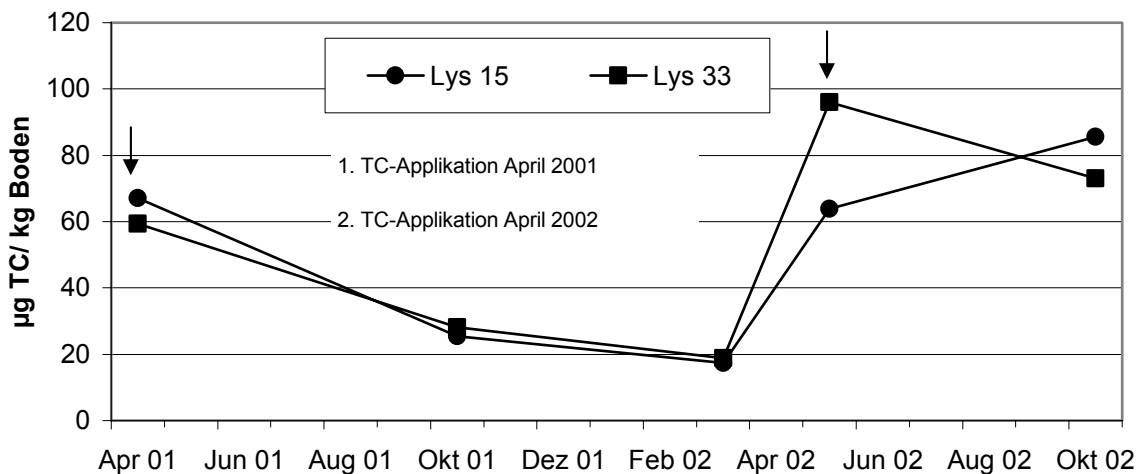


Abbildung 28: Verlauf der TC-Gesamt-Konzentration im Boden bei ausgewählten Lysimetern, Fruchtart Roggen, Zeitraum Frühjahr 2001 bis Herbst 2002 (Lys. 15 + 33 = 67,2 mg TC (2001)/ 66,5 mg TC (2002))

Die anfangs nachweislich unbelasteten Böden zeigten bei wiederholter Gülle- und somit Wirkstoffgabe eine ansteigende Tendenz hinsichtlich der TC-Gehalte. Im Zeitraum Frühjahr 2001 bis März 2002 wurde nicht die gesamte TC-Menge im Boden abgebaut, so dass mit einer erneuten Wirkstoffgabe im April 2002 die TC-Konzentration den Vorjahreswert überstieg. Da 2001 und 2002 gleiche Wirkstoffmengen appliziert wurden, ist dieser Konzentrationsanstieg nur mit einer Akkumulationsneigung des Wirkstoffes zu erklären. Interessanterweise änderte sich bei den Lysimetern mit der Fruchtart Roggen die TC-Konzentration im Boden ab der zweiten TC-Gabe bis zum Oktober 2002 nur unwesentlich. Dieser Effekt kann durch die Probenahme bedingt sein, allerdings zeigt er sich auch bei zwei Lysimetern mit Mais (Lys. 4 und 35). Ein Erklärungsansatz könnte sein, dass das Jahr 2002 im Beprobungszeitraum trockener war als das Vorjahr. Von der 13. KW bis zur 40. KW 2002 (Beprobungszeitraum Winterroggen) fiel ca. 12 %, von der 19. KW bis zur 40. KW (Beprobungszeitraum Mais) sogar ca. 20 % weniger Niederschlag. Möglicherweise sind in einem insgesamt feuchteren Boden die Bedingungen zum Abbau des Tetrazyklins besser gegeben als in einem etwas trockeneren Milieu.

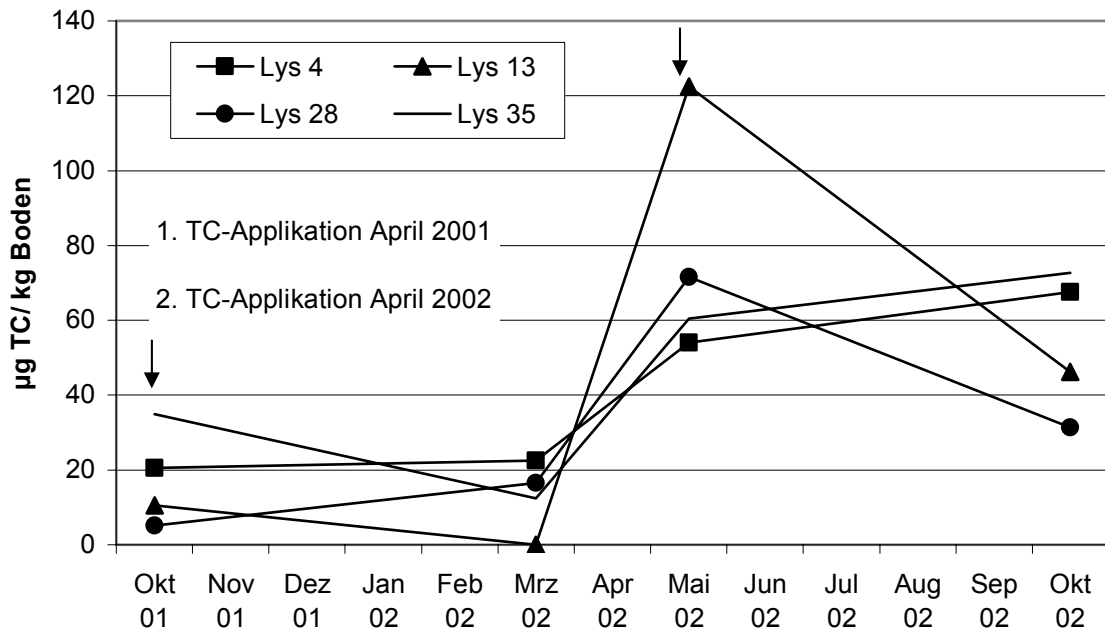


Abbildung 29: Verlauf der TC-Gesamt-Konzentration im Boden bei ausgewählten Lysimetern, Fruchtart Mais, Zeitraum Herbst 2001 bis Herbst 2002 (Lys. 4 + 28 = 45,0 mg TC (2001)/ 44,3 mg TC (2002); Lys. 13 + 35 = 67,2 mg TC (2001)/ 66,5 mg TC (2002))

Die Boden-TC-Gehalte ausgewählter Lysimeter mit der Fruchtart Mais lagen im März 2002, also kurz vor der zweiten Wirkstoffgabe, in vergleichbarer Höhe wie im Herbst 2001 (Abb. 29); deutlich abgebaut wurde das Tetrazyklin im Verlaufe des Winters nicht. Am Beispiel des Lysimeters 13 soll der Jahresverlauf verdeutlicht werden: im Herbst 2001 wurde ein TC-Gehalt von 10,6 µg/kg nachgewiesen; mit der erneuten Applikation von TC-dotierter Gülle stieg im April 2002 die TC-Konzentration auf 122,5 µg/kg an, um dann bis zum Herbst 2002 wieder auf ein gegenüber Herbst 2001 höheres Niveau von 46,2 µg/kg abzufallen.

Aus den vorliegenden Ergebnissen ist kein eindeutiger Einfluss der Dosierungsstufe abzuleiten. Lysimeter 13 enthielt zwar mit einem Messwert von über 120 µg/kg TC im Frühjahr 2002 als höchstdosierte Variante die

Maximalkonzentration, demgegenüber wies aber Lysimeter 35 als Wiederholung mit gleicher Dosierung deutlich geringere Konzentrationen an TC auf.

4.3.2.2 Sulfadiazin

65 Wasserproben unter Mais und 91 Wasserproben unter Roggen wurden im zweiten Versuchsjahr (2002) zusätzlich auf Sulfadiazin untersucht. Sulfadiazin konnte dabei oberhalb der Bestimmungsgrenze von 6 µg/l nicht nachgewiesen werden.

Die Bodenproben aus den Nullvarianten wiesen ebenfalls kein Sulfadiazin auf. Die Ergebnisse der Bodenuntersuchungen zur Entwicklung der SD-Gehalte unter Mais und Roggen sind in den Abbildungen 30 und 31 dargestellt:

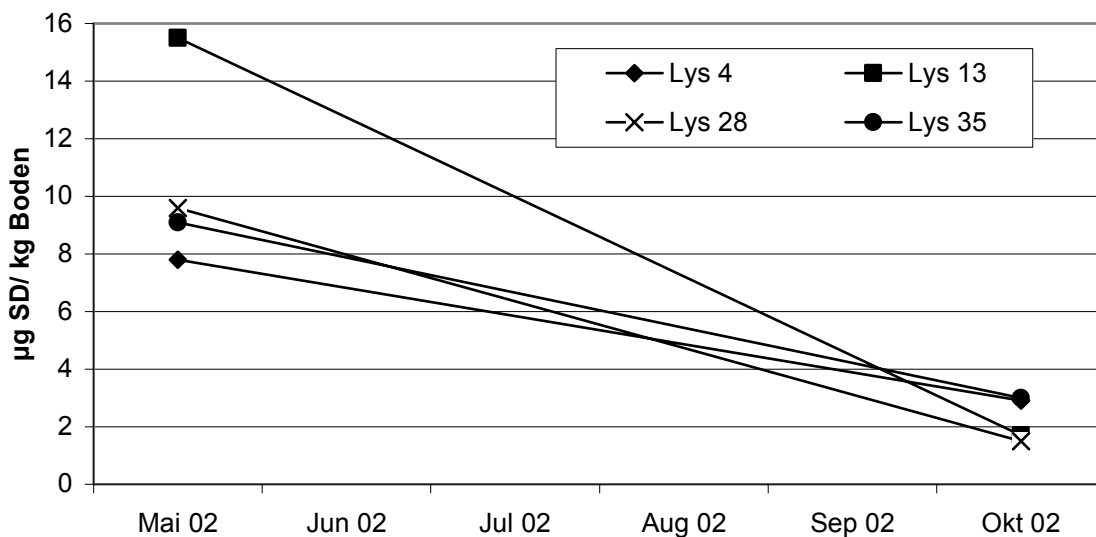


Abbildung 30: Verlauf der SD-Konzentration im Boden bei ausgewählten Lysimetern, Fruchtart Mais, Zeitraum Frühjahr 2002 bis Herbst 2002 (Lys. 4 + 28 = 44,3 mg SD; Lys. 13 + 35 = 66,5 mg SD)

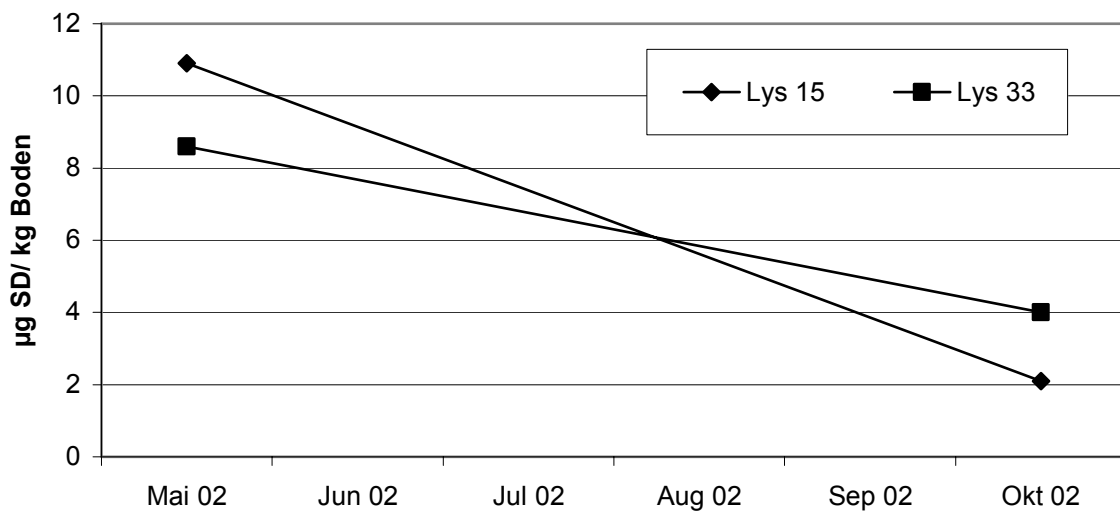


Abbildung 31: Verlauf der SD-Konzentration im Boden bei ausgewählten Lysimetern, Fruchtart Roggen, Zeitraum Frühjahr 2002 bis Herbst 2002 (Lys. 15 + 33 = 66,5 mg SD)

Trotz gleicher Dosierung des Wirkstoffes erreichte Sulfadiazin im Boden nur eine Maximalkonzentration von 15,5 µg/kg und lag damit deutlich unter den Tetrazyklingehalten. Weiterhin erfolgte eine deutliche Abnahme über den Probenahmezeitraum, so dass im Herbst 2002 nur noch Konzentrationen von maximal 4 µg/kg nachgewiesen werden konnten.

5 Teilvorhaben 3: Antibiotikaresistenz in Böden: Modellversuche zur Etablierung, Verbreitung und Persistenz

5.1 Experimenteller Ansatz

Untersuchte Böden und deren Aufarbeitung

In den Vorversuchen wurden die Böden „Grönheimer Feld“ und „Borstel“ verwendet. Der Boden „Grönheimer Feld“ sollte als unbelasteter Kontrollboden eingesetzt werden. Im Laufe der Untersuchungen wurde aber eine Kontamination mit Chlortetrazyklin gemessen, so dass der Boden in den Hauptversuchen nicht mehr eingesetzt werden konnte. Der Boden Borstel wurde in den Vorversuchen als unbelasteter Boden mit sehr niedrigem organischen Gehalt eingesetzt. Im zweiten Vorversuch wurde als zusätzliche Variante eine Rinderdungapplikation eingeführt, um a) den Nährstoffgehalt im Boden zu erhöhen und somit die Aktivität der Mikroorganismen und deren Zellvermehrung zu steigern und b) gleichzeitig den normalen Auftragspfad des Antibiotikums über Dung bzw. Gülle zu imitieren.

Der Boden für die Hauptuntersuchungen stammte von den Daueruntersuchungsflächen Dinklage bzw. Uesen und wurde freundlicher Weise von Herrn Dr. H. Höper (Niedersächsischen Landesamt für Bodenforschung) zur Verfügung gestellt. Die beiden Böden unterscheiden sich in der Vorbehandlung mit Tetrazyklin. Während im Boden „Uesen“ kein Tetrazyklin nachgewiesen wurde, finden sich im Boden „Dinklage“ aufgrund von Gülledüngung zwischen 100 und 200 µg Tetrazyklin /kg Boden (Tab. 19). Somit kann die Wirkung der Applikation verschiedener Tetrazyklinmengen auf einen adaptierten Boden und einen unbehandelten „Kontrollboden“ untersucht werden. Der Tetrazyklingehalt in Gülle ist neben der verabreichten Menge auch von der Konsistenz der Gülle abhängig. In einer Screeninguntersuchung an Schweinegülle wurden in knapp einem Viertel von 181 Proben Tetrazylinkonzentrationen von 0,6 – 66 mg/l gemessen (Grafe 2000). Laut Höper et al. (2002) stellt sich bei einer Güllezufuhr von 30 m³ pro ha und Jahr und einer durchschnittlichen Konzentration von 4 mg/l ein Gehalt von 29 µg/kg

Boden im Pflughorizont (0 – 30 cm, Dichte 1,4 g/cm³) ein - bei Vernachlässigung eventueller Abbauprozesse. Bei einer Konzentration von 66 mg/l ergibt sich ein Gehalt von 470 µg/kg Boden. Tatsächlich wurden auf Flächen die mit Schweinegülle beaufschlagt wurden Gehalte von 20 – 249 µg/kg Boden (Höper et al. 2002).

Zusätzlich zum Tetrazyklingehalt unterscheiden sich die beiden Böden in ihren physikalischen Eigenschaften und ihrer mikrobiellen Biomasse. Somit kann auch der Einfluss dieser Parameter auf die Antibiotikawirkung erfasst werden. Die Kenndaten der Böden sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Bodenkenndaten der in den Versuchen eingesetzten Böden. B = Borstel; GF = Grönheimer Feld; D = Dinklage; U = Uesen

Boden	Tetrazyklin *Chlortetrazyklin (µg/kg)	Ton (%)	Schluff (%)	Sand (%)	Boden- typ	WHK _{max} (ml/kg)	pH	C _{org} (%)	C _{mik} (mg/kg)
B	-	3,6	25,6	70,8	Su3	269,0	5,9	0,93	168
GF	4*	4,5	12,1	83,4	Su2	364,6	5,3	2,73	145
D	100 – 200	2,4	6,1	91,6	Ss	365,3	4,5	1,83	94
U	-	7,6	10,0	82,4	Sl2	343,7	6,2	2,60	208

Die Böden wurden gesiebt (≤ 2 mm) und auf 50 % ihrer maximalen WHK eingestellt. Anschließend wurden die Böden auf die gewünschten TC-Konzentrationen eingestellt. Die in den Vor- bzw. Hauptversuchen eingestellten Konzentrationen waren wie folgt:

Vorversuch 1

Probe	Ansatz
GF1	Boden Grönheimer Feld ohne Tetrazyklin
GF2	Boden Grönheimer Feld mit 0,01 mg Tetrazyklin/kg Boden
GF3	Boden Grönheimer Feld mit 0,1 mg Tetrazyklin/kg Boden
GF4	Boden Grönheimer Feld mit 1 mg Tetrazyklin/kg Boden
GF5	Boden Grönheimer Feld mit 10 mg Tetrazyklin/kg Boden

Vorversuch 2

Probe	Ansatz
GF1	Boden Grönheimer Feld ohne Tetrazyklin
GF2	Boden Grönheimer Feld ohne Tetrazyklin mit Dung
GF3	Boden Grönheimer Feld mit 100 mg Tetrazyklin/kg Boden
GF4	Boden Grönheimer Feld mit 100 mg Tetrazyklin/kg Boden mit Dung
GF5	Boden Grönheimer Feld mit 1000 mg Tetrazyklin/kg Boden
GF6	Boden Grönheimer Feld mit 1000 mg Tetrazyklin/kg Boden mit Dung
B1	Boden Borstel ohne Tetrazyklin
B2	Boden Borstel ohne Tetrazyklin mit Dung
B3	Boden Borstel mit 5 mg Tetrazyklin/kg Boden
B4	Boden Borstel mit 5 mg Tetrazyklin/kg Boden mit Dung
B5	Boden Borstel mit 50 mg Tetrazyklin/kg Boden
B6	Boden Borstel mit 50 mg Tetrazyklin/kg Boden mit Dung

Hauptversuch

Probe	Ansatz
D1	Boden Dinklage ohne Tetrazyklin
D2	Boden Dinklage mit 1 mg Tetrazyklin/kg Boden
D3	Boden Dinklage mit 10 mg Tetrazyklin/kg Boden
D4	Boden Dinklage mit 1000 mg Tetrazyklin/kg Boden
U1	Boden Kontrolle (Uesen) ohne Tetrazyklin
U2	Boden Kontrolle (Uesen) mit 1 mg Tetrazyklin/kg Boden
U3	Boden Kontrolle (Uesen) mit 10 mg Tetrazyklin/kg Boden
U4	Boden Kontrolle (Uesen) mit 1000 mg Tetrazyklin/kg Boden

Die Angabe kg Boden entspricht der Trockenmasse.

Die Böden wurden vor der Tetrazyklinapplikation (Tag 0) und, je nach Versuchsansatz, 7, 14, 28, 56 und 84 Tage nach der Applikation beprobt.

5.2 Nachweis und Quantifizierung von Tetrazyklin-Resistenzgenen

Tetrazykline inhibieren das Wachstum von Bakterien, indem sie die Proteinbiosynthese unterbrechen. Bis heute wurden 61 Tetrazyklin-Resistenzgene sequenziert, die in 32 Klassen eingeteilt werden. Es gibt drei spezifische Resistenz-Mechanismen gegenüber Tetrazyklinen: Ausschleusen (Efflux) von Tetrazyklin, Schutz der Ribosomen und Modifikation von Tetrazyklin. Tetrazyklin-Efflux und Ribosomen-Schutz sind am weitesten unter den Bakterien verbreitet. Die entsprechenden Resistenzgene sind meistens auf mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden (ringförmige DNA-Moleküle) und/oder Transposons (springenden Genen) lokalisiert. Der Tetrazyklin-Efflux wird über Export-Proteine erreicht, die in der Membran lokalisiert sind, der Ribosomen-Schutz durch lösliche Proteine, die Ähnlichkeit mit Proteinen aufweisen, die an der Proteinbiosynthese beteiligt sind (Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-G).

Die unterschiedlichen Bodenansätze wurden auf das Vorhandensein von 10 Tetrazyklin-Resistenzgenen untersucht. Hierzu gehörten die Resistenzgene der Klassen A, B, D, E, M, O, Q, S, T und W. Der Resistenzmechanismus für die Klassen A, B, D, und E beruht auf dem Tetrazyklin-Efflux, der Resistenzmechanismus der übrigen untersuchten Klassen auf dem Ribosomen-Schutz.

Der spezifische Nachweis der Tetrazyklin-Resistenzgene erfolgte mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR). Hierzu wurde aus den Bodenproben die genomische DNA extrahiert und anschließend die entsprechenden Gene spezifisch vervielfältigt (amplifiziert). Zur Kontrolle, ob nach der DNA-Extraktion noch inhibierende Substanzen (z. B. Huminstoffe) in der DNA-Lösung vorkommen, wurden die bakteriellen 16S rRNA-Gene

amplifiziert. Diese Gene sind ubiquitär verbreitet und sollten immer ein positives Signal ergeben.

5.2.1 Nachweis von Tetrazyklin-Resistenzgenen

5.2.1.1 Methodik

Die PCR ist eine enzymatische *in vitro* Reaktion zur Vermehrung (Amplifikation) und Modifikation von DNA. Sie benötigt zwei Oligonukleotide (Primer genannt), die die zu amplifizierende Region flankieren müssen und dabei an die gegenüberliegenden Stränge des Templates hybridisieren. Dabei sind die gebundenen Primer mit ihrem 3'-Ende so orientiert, dass sie sich gegenüberliegen und die DNA-Synthese (durch eine besondere, thermostabile DNA-Polymerase) über die Region des Original-DNA-Templates verläuft, die von den Primern eingegrenzt wird. Da jeder Primer auch zu einem der neu synthetisierten Stränge komplementär ist, kann jeder neue Strang in den folgenden Zyklen als ein Template dienen. Diese Konstellation bewirkt, dass in einer Art "Kettenreaktion" durch die ständige Wiederholung von Denaturierung, Primerannealing und DNA-Extension der von den Oligonukleotiden eingegrenzte DNA-Abschnitt exponentiell amplifiziert wird. Das Endprodukt ist ein DNA Doppelstrang-Molekül, dessen 5'-Enden exakt den eingesetzten Oligonukleotiden entsprechen. Zur spezifischen Amplifikation der Resistenzgene wurde die HotStartTaq der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Für die PCR wurden die extrahierten DNA-Lösungen 1:100 verdünnt (in der unverdünnten Lösung waren noch inhibierende Substanzen) und von dieser Verdünnung wurde 1 µl in einen 50 µl PCR-Ansatz gegeben. Als Kontrolle dienten die entsprechenden klonierten Resistenzgene. Die PCR lief anschließend mit 60 Zyklen. Als Primer wurden verwendet:

Tet A (Guillaume et al. 2000)

TETAFW4 5'-GGC CTC AAT TTC CTG ACG-3'

TETARV1 5'-AAG CAG GAT GTA GCC TGT GC-3'

Annealing-Temperatur: 51 °C

Tet B (Guillaume et al. 2000)

TETBFW35'-GAG ACG CAA TCG AAT TCG G-3'

TETBRV1 5'-TTT AGT GGC TAT TCT TCC TGC C-3'

Annealing-Temperatur: 55 °C

Tet D (Guillaume et al. 2000)

TETDFW25'-GGA TAT CTC ACC GCA TCT GC-3'

TETDRV1 5'-CAT CCA TCC GGA AGT GAT AGC-3'

Annealing-Temperatur: 55 °C

Tet E (Guillaume et al. 2000)

TETEFW35'-TCC ATA CGC GAG ATG ATC TCC-3'

TETERV2 5'-CGA TTA CAG CTG TCA GGT GGG-3'

Annealing-Temperatur: 55 °C

Tet M (Aminov et al. 2001)

TetM-FW 5'-ACA GAA AGC TTA TTA TAT AAC-3'

TetM-RV 5'-TGG CGT GTC TAT GAT GTT CAC-3'

Annealing-Temperatur: 51 °C

Tet O (Aminov et al. 2001)

TetO-FW 5'-ACG GA(A/G) AGT TTA TTG TAT ACC-3'

TetO-RV 5'-TGG CGT ATC TAT AAT GTT GAC-3'

Annealing-Temperatur: 60 °C

Tet Q (Aminov et al. 2001)

TetQ-FW 5'-AGA ATC TGC TGT TTG CCA GTG-3'

TetQ-RV 5'-CGG AGT GTC AAT GAT ATT GCA-3'

Annealing-Temperatur: 63 °C

Tet S (Aminov et al. 2001)

TetS-FW 5'-GAA AGC TTA CTA TAC AGT AGC-3'

TetS-RV 5'-AGG AGT ATC TAC AAT ATT TAC-3'

Annealing-Temperatur: 50 °C

Tet T (Aminov et al. 2001)

TetT-FW 5'-AAG GTT TAT TAT ATA AAA GTC-3'

TetT-RV 5'-AGG TGT ATC TAT GAT ATT TAC-3'

Annealing-Temperatur: 46 °C

Tet W (Aminov et al. 2001)

TetW-FW 5'-GAG AGC CTG CTA TAT GCC AGC-3'

TetW-RV 5'-GGG CGT ATC CAC AAT GTT AAC-3'

Annealing-Temperatur: 64 °C

Nach der PCR wurde das PCR-Produkt auf einem Agarosegel aufgetrennt. Der Nachweis der Spezifität erfolgte zum einen über die Fragmentgröße zum anderen über Sequenzierung einzelner, aus dem Gel ausgeschnittener Banden.

5.2.1.2 Ergebnisse und Auswertung**A. Vorversuch 1**

Im Vorversuch 1 wurde von jedem Ansatz 1 Stichprobe genommen. Die Tetrazyklin-Konzentration der einzelnen Ansätze betrug zwischen 10 µg und 10 mg/kg Boden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Qualitativer Nachweis der Tetrazyklin-Resistenzgene (Tet A, B, D, E, M, O, Q, S, T, W) im Vorversuch 1 mit Boden vom Grönheimer Feld (GF). Die einzelnen Ansätze wurden mit unterschiedlichen Mengen an Tetrazyklin versetzt (1 = ohne Tetrazyklin, 2 = 0,01 mg Tetrazyklin/kg Boden, 3 = 0,1 mg Tetrazyklin/kg Boden, 4 = 1 mg Tetrazyklin/kg Boden, 5 = 10 mg Tetrazyklin/kg Boden) und für 0, 14 bzw. 28 Tage inkubiert. Von jeder Bodenprobe wurde 1 Stichprobe untersucht. - = Tetrazyklin-Resistenzgene wurden nicht nachgewiesen, + = Tetrazyklin-Resistenzgene wurden nachgewiesen.

	Tet A	Tet B	Tet D	Tet E	Tet M	Tet O	Tet Q	Tet S	Tet T	Tet W
GF1, 0	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
GF2, 0	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
GF3, 0	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
GF4, 0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GF5, 0	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
GF1, 7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
GF2, 7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
GF3, 7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
GF4, 7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
GF5, 7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
GF1, 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
GF2, 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GF3, 14	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
GF4, 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GF5, 14	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
GF1, 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
GF2, 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GF3, 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
GF4, 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GF5, 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

In diesem Vorversuch wurden Tetrazyklin-Resistenzgene nur sporadisch detektiert. Auch ohne Tetrazyklin-Zugabe (Zeitpunkt 0, Tet Q) wurden Resistenzgene gefunden. Am häufigsten wurden Resistenzgene der Klassen Tet W und Tet Q gefunden. In einem zweiten Vorversuch wurde die Tetrazyklin-Konzentration erhöht und die Inkubationsdauer verlängert.

Tabelle 21: Fortsetzung. Qualitativer Nachweis der Tetrazyklin-Resistenzgene im Vorversuch 2 mit Boden vom Grönheimer Feld (GF) bzw. Borstel (B). Die Bodenproben wurden mit unterschiedlichen Mengen an Tetrazyklin versetzt (1, 2 = ohne Tetrazyklin, 3, 4 = 5 (B) bzw. 100 mg (GF) Tetrazyklin/kg Boden, 5, 6 = 50 (B) bzw. 1000 mg (GF) Tetrazyklin/kg Boden) und für 0, 14, bzw. 28. Das Vorkommen von Tet Q wurde zusätzlich noch am 56 und 84 Tag bestimmt, da die Anzahl dieses Resistenzgens während der Inkubation anstieg. Die Ansätze 2, 4 und 6 wurden zusätzlich mit Dung versetzt. Von jeder Bodenprobe wurde 1 Stichprobe untersucht. - = Tetrazyklin-Resistenzgene wurden nicht nachgewiesen, + = Tetrazyklin-Resistenzgene wurden nachgewiesen, n.b. = Tetrazyklin-Resistenzgene wurden nicht bestimmt.

	Tet A	Tet B	Tet D	Tet E	Tet M	Tet O	Tet Q	Tet S	Tet T	Tet W
B6, 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
GF1, 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GF2, 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GF3, 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GF4, 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GF5, 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GF6, 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B1, 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B2, 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
B3, 28	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B4, 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B5, 28	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B6, 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
GF1, 56	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	n.b.
GF2, 56	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	n.b.
GF3, 56	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	n.b.
GF4, 56	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	n.b.
GF5, 56	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	n.b.
GF6, 56	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	n.b.
B1, 56	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	n.b.
B2, 56	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	n.b.
B3, 56	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	n.b.
B4, 56	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	n.b.
B5, 56	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	n.b.
B6, 56	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	n.b.
GF1, 84	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	n.b.
GF2, 84	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	n.b.
GF3, 84	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	n.b.

Tabelle 21: Fortsetzung

GF4, 84	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	n.b.
GF5, 84	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	n.b.
GF6, 84	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	n.b.
B1, 84	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	n.b.
B2, 84	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	n.b.
B3, 84	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	n.b.
B4, 84	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	n.b.
B5, 84	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	n.b.
B6, 84	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	n.b.

Wie auch im Vorversuch 1 wurden die meisten Tetrazyklin-Resistenzgene nur sporadisch gefunden. Auch ohne Inkubation mit Tetrazyklin (Zeitpunkt 0, Tet D, Tet W) wurden Resistenzgene gefunden. Am häufigsten wurden Resistenzgene der Klassen Tet W und Tet Q gefunden, wobei bei Tet Q die Anzahl der Resistenzgene über die Versuchsdauer ansteigt.

Der Rinderdung hatte keinen Einfluss auf das zusätzliche Auftreten von Resistenzgenen. In wie weit das Auftreten von Resistenzgenen unterdrückt wurde, kann mit diesem Versuch nicht bestimmt werden, da auch bei den Proben ohne Rinderdung Resistenzen nur sporadisch aufgetreten sind.

C. Hauptversuch

Im Hauptversuch wurden von jedem Ansatz 4 Stichproben genommen und unabhängig voneinander bearbeitet. Die Tetrazyklin-Konzentration der einzelnen Ansätze betrug zwischen 1 mg und 1000 mg/kg Boden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Qualitativer Nachweis der Tetrazyklin-Resistenzgene im Hauptversuch mit Boden aus Dinklage (D) und Uesen (U). Die Bodenproben wurden mit unterschiedlichen Mengen an Tet versetzt (1 = ohne Tet, 2 = 10 mg Tetrazyklin/kg Boden, 3 = 100 mg Tet/kg Boden, 4 = 1000 mg Tetrazyklin/kg Boden) und für 0, 14, 28 bzw. 56 Tage inkubiert. Von jeder Bodenprobe wurden 4 unabhängige Stichproben untersucht. - = Tet-Resistenzgene wurden nicht nachgewiesen, + = Tet-Resistenzgene wurden nachgewiesen, Anzahl der, + ' = Anzahl positiver Nachweise.

[illegible]

In den insgesamt 128 untersuchten Stichproben wurden keine Tetrazyklin-Resistenzgene der Klassen A, B, D, E und T gefunden. Für die Klassen M und S wurden sporadisch jeweils in 1 Stichprobe positive Signale detektiert, für die Klasse Q in 4 Stichproben, für die Klasse O in 6 Stichproben und für die Klasse W in 15 Stichproben. Bei 4 Tetrazyklin-Resistenzgenklassen (M, O, Q und W) wurden sowohl in dem Boden Dinklage als auch Uesen vor der Inkubation Resistenzgene detektiert.

Das nur sporadische Auftreten der meisten positiven Signale ist ein Hinweis, dass Resistenzen – wenn sie denn auftreten oder induziert werden – räumlich sehr begrenzt im Boden vorkommen. Man muss hierbei die Größe der untersuchten Mikroorganismen von wenigen μm – die die Träger der Resistenzgene sind – im Verhältnis zu den untersuchten Bodenproben berücksichtigen. Warum bestimmte Resistenzgen-Klassen gefunden werden und andere nicht wird vom Zufall abhängen. Auch bei den 15 positiven Signalen, die bei der Tetrazyklin-Resistenzgenklasse W im gesamten Versuchsverlauf gefunden wurden, ist keine Kinetik der Tetrazyklin-Resistenzgene über die Inkubationszeit zu erkennen.

5.2.2 Quantifizierung der Tetrazyklin-Resistenzgene

5.2.2.1 Methodik

Die Quantifizierung der Tetrazyklin-Resistenzgene erfolgte mit dem QuantiTect Sybr Green PCR Kit (Qiagen) auf dem Sequence Detection System 7700 (Applied Biosystems) Bei diesem System findet die Detektion des Farbstoffs Sybr Green – der während der PCR in doppelsträngige DNA eingelagert wird – mittels Laser statt. Dabei leuchtet der Laser von oben in jedes Reaktionsgefäß. Es wurden ausschließlich Gene der Tetrazyklin-Resistenzgenklasse W aus dem Hauptversuch untersucht, da dieses Resistenzgen mit Abstand am häufigsten gefunden wurde. Zur Quantifizierung wurde das klonierte TetW-Gen als Referenz verwendet. Zur Kontrolle der Spezifität wurde das PCR-Produkt im

Anschluss an die quantitative PCR auf einem Agarosegel aufgetrennt und die Größe mit Hilfe eines Längenstandards bestimmt.

5.2.2.2 Ergebnisse und Auswertung

Bei der Quantifizierung der Tetrazyklin-Resistenzgene der Klasse W in der eingesetzten DNA-Lösung wurden Werte zwischen 515 und 1400 Genen ermittelt. Bei einer theoretischen Annahme, dass 1 Tetrazyklin-Resistenzgen in der PCR ein positives Signal ergibt, müssen – auf Grund der Umstände, dass die DNA aus 1 g Boden in 50 µl Puffer aufgenommen und vor der PCR 1:100 verdünnt wird – die gemessenen Werte mit 5.000 multipliziert werden. In den Böden „Uesen“ und „Dinklage“ wurden somit $2,575 \times 10^6$ bis $7,0 \times 10^6$ Tetrazyklin-Resistenzgene der Klasse W detektiert. Da während der DNA-Extraktion zusätzlich DNA verloren geht, und 1 Gen meist nicht für ein positives Signal in der PCR ausreicht, liegt der tatsächliche Wert wahrscheinlich um den Faktor 10 höher. Auch mit der quantitativen Resistenzgen-Bestimmung war keine Korrelation zwischen Antibiotikakonzentration und Genanzahl im Verlauf der Inkubationszeit zu erkennen, da die Anzahl der Resistenzgene nicht kontinuierlich anstieg.

5.3 Struktur bakterieller Bodengemeinschaften

Der Einfluss von Tetrazyklin auf die bakterielle Lebensgemeinschaft wurde mit der T-RFLP (Terminaler-Restriktionsfragment Längenpolymorphismus)-Analyse – einer molekularbiologischen Fingerprinting-Technik – vergleichend untersucht. Wie bei der schon seit langem zur Differenzierung von Reinkulturen eingesetzten RFLP-Methode wird bei der T-RFLP-Analyse aus der zu untersuchenden Bodenprobe die genomische DNA extrahiert, die 16S rRNA Gene amplifiziert, das PCR-Produkt mit Restriktionsenzymen verdaut und anschließend elektrophoretisch getrennt. Das Besondere an der T-RFLP-Methode ist, dass ein PCR-Primer fluoreszenzmarkiert ist, und bei der

elektrophoretischen Trennung (nach Länge der Fragmente) ausschließlich fluoreszierende Fragmente – die terminalen Fragmente – mittels Laser detektiert werden. Jedes 16S rRNA Gen ergibt somit nach dem Verdau nur ein Fragment bei der Detektion. Die dadurch gegebene starke Reduzierung der Fragmentanzahl ermöglicht, dass mit dieser Methode Bodenproben – in denen eine sehr hohe Diversität an unterschiedlichen Mikroorganismen existiert – untersucht werden können. Eine direkte Korrelation der Fragmente zu einzelnen Bakterienarten ist aber nicht möglich, da unterschiedliche Arten gleiche Fragmentgrößen zeigen können.

5.3.1 Methodik

Für die PCR wurden die extrahierten DNA-Lösungen 1:100 verdünnt (in der unverdünnten Lösung waren noch inhibierende Substanzen) und von dieser Verdünnung wurde 1 µl in einen 100 µl PCR-Ansatz gegeben. Die PCR lief anschließend mit 30 Zyklen. Als Primer wurden *Bacteria*-spezifische Oligonukleotide verwendet:

BAC27F5'-GAG TTT GAT C(A/C)T GGC TCA G-3'; 5'-FAM-markiert

BAC1378R 5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3'

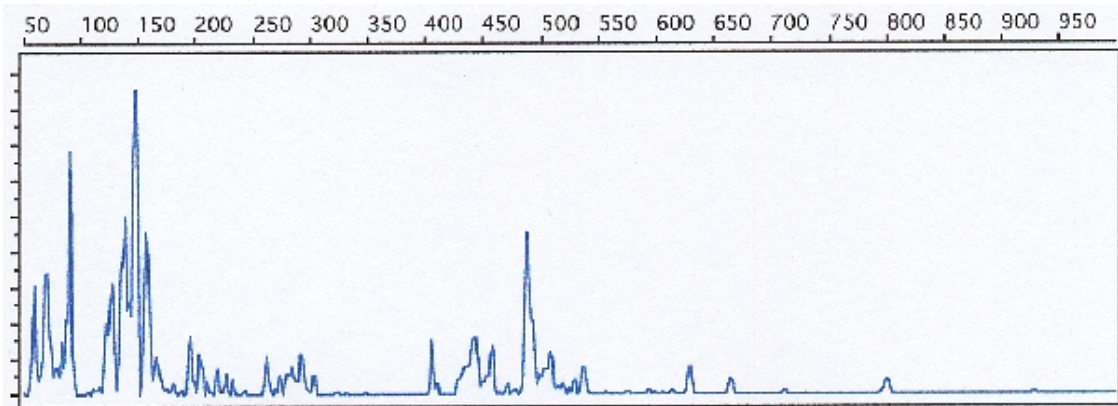
Annealing-Temperatur: 48 °C

Nach der PCR wurde das PCR-Produkt mit dem Restriktionsenzym *MspI* für 3 Stunden bei 37 °C verdaut und anschließend mit dem MinElute PCR-Aufreinigungskit (Qiagen) aufgereinigt. Anschließend wurden die Proben auf dem ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (DNA-Sequenzierer) mit der GeneScan Analysis Software analysiert. Die Bestimmung der Fragmentlänge erfolgte mittels internen Längenstandards (GeneScan Rox-1000). Dadurch ist der Vergleich auch unterschiedlicher T-RFLP-Muster möglich.

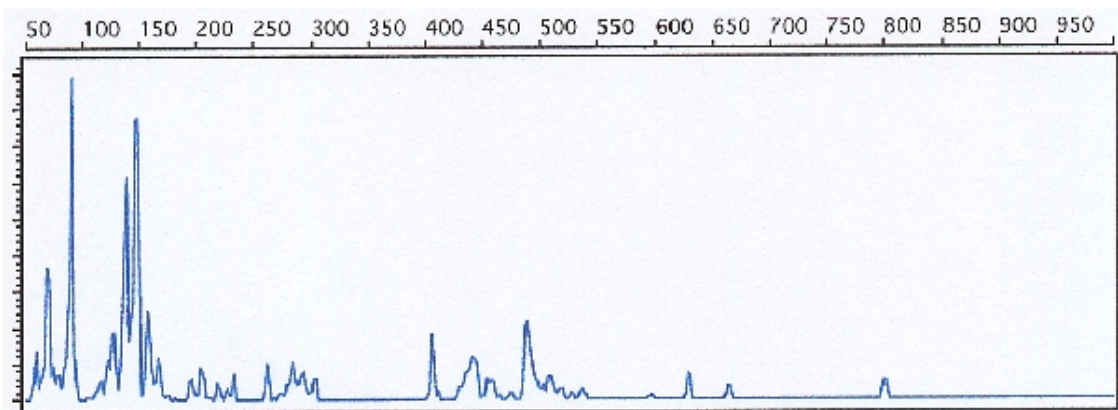
5.3.2 Ergebnisse und Auswertung

Die T-RFLP-Methode hat wie alle molekularen Fingerprinting-Techniken den Vorteil, dass auch nicht-kultivierbare Mikroorganismen – die im Boden zahlenmäßig deutlich überwiegen (> 99 %) – erfasst werden. Ein spezifischer Vorteil der T-RFLP-Methode gegenüber anderen molekularbiologischen Fingerprinting-Techniken ist die hohe Reproduzierbarkeit und die teilweise Automatisierung. Die hohe Reproduzierbarkeit wird durch die Verwendung interner Längenstandards erreicht, die in jeder zu analysierenden Probe mitlaufen. Dadurch können auch unterschiedliche T-RFLP-Muster miteinander verglichen werden. Die teilweise Automatisierung ist durch die Verwendung des DNA-Sequenziergerätes gegeben. Eine Limitation der Methode ist, dass die einzelnen Fragmente eines T-RFLP-Musters nicht direkt phylogenetischer Information zugeordnet werden können, das heißt, es ist nicht bekannt, welche Bakteriengruppe(n) sich hinter einem Fragment verbirgt (verbergen).

Beispielhaft werden in den Abbildungen 32 - 34 sechs unterschiedliche T-RFLP Muster gezeigt.



a) Vorversuch 2: Grönheimer Feld, Tag 0

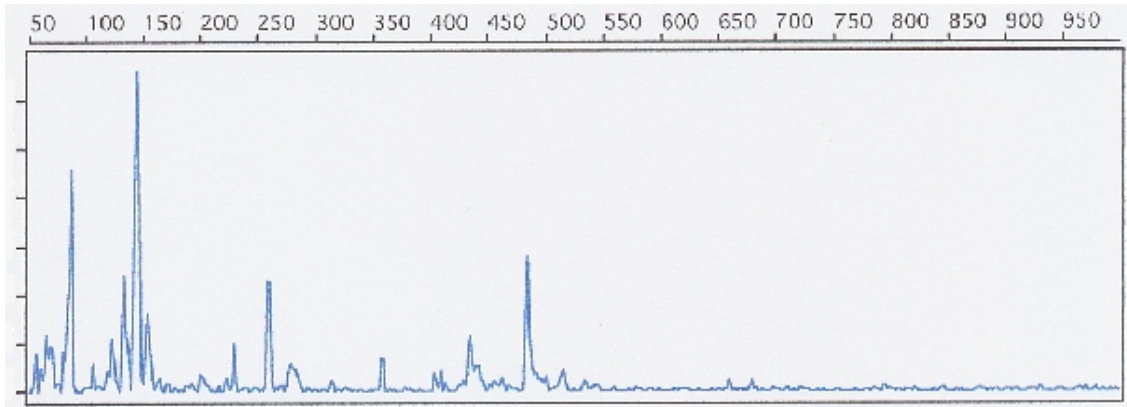


b) Vorversuch 2: Grönheimer Feld, Tag 56, 1000 mg Tetrazyklin/kg Boden

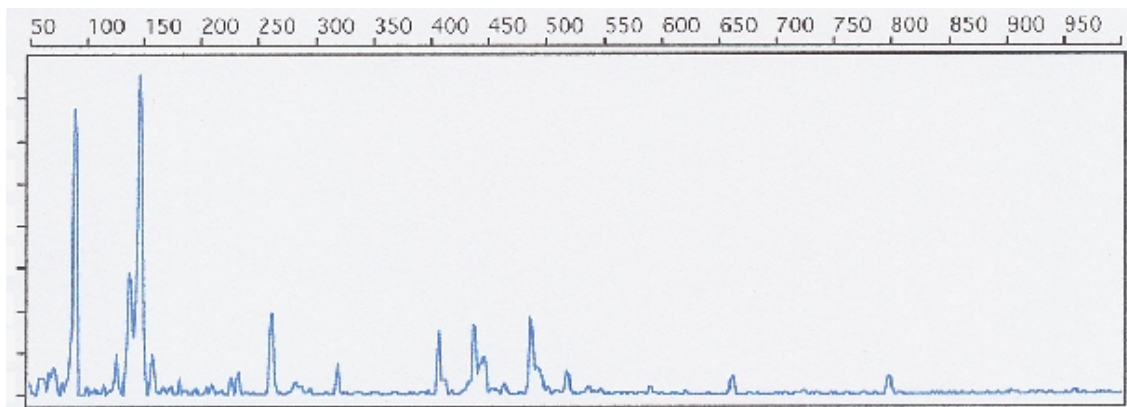
Abbildung 32: T-RFLP Muster der Struktur der bakteriellen Lebensgemeinschaft im Boden Grönheimer Feld zu Beginn der Inkubationsversuche (a) und nach 56 Tagen (b). Auf der X-Achse ist die Fragmentlänge (bp) dargestellt, auf der Y-Achse die Signalintensität (Fluoreszenz).

Jedes T-RFLP Muster besteht aus 40 bis 60 unterschiedlichen terminalen Restriktionsfragmenten (Peaks). Ein Peak besteht bei so komplexen Lebensgemeinschaften wie denen des Bodens meistens aus mehreren, in der Sequenz unterschiedlichen Fragmenten, die aber alle die gleiche Enzymschnittstelle an derselben Position besitzen. Die einzelnen Peaks stellen

somit keine phylogenetischen Einheiten sondern sogenannte OTUs (operational taxonomic units) dar.



a) Hauptversuch: Dinklage, Tag 0

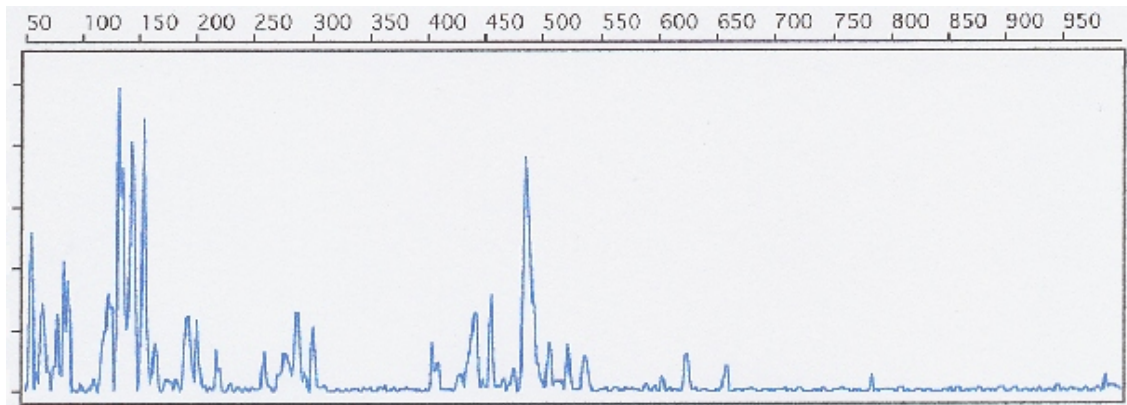


b) Hauptversuch: Dinklage, Tag 56, 1000 mg Tetrazyklin/kg Boden

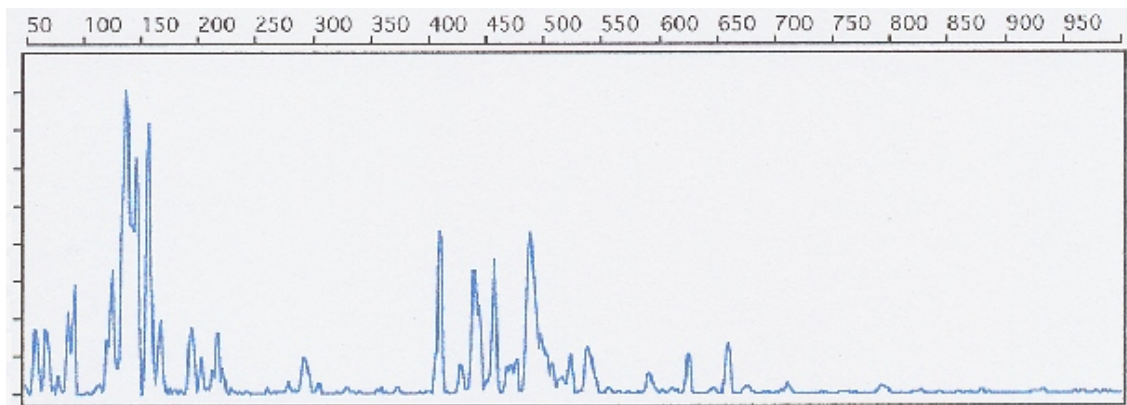
Abbildung 33: T-RFLP Muster der Struktur der bakteriellen Lebensgemeinschaft im Boden Dinklage zu Beginn der Inkubationsversuche (a) und nach 56 Tagen (b). Auf der X-Achse ist die Fragmentlänge (bp) dargestellt, auf der Y-Achse die Signalintensität (Fluoreszenz).

Zwischen den T-RFLP Mustern der unterschiedlichen Böden gibt es keine sehr ausgeprägten Unterschiede. Wobei hier erwähnt werden muss, dass zur Amplifikation der 16S rRNA-Gene *Bacteria*-spezifische Primer verwendet

wurden. Diese Primer binden bei nahezu allen heute bekannten Bakterien. Dabei werden methodisch bedingt nur die dominanten Vertreter der Lebensgemeinschaft detektiert.



a) Hauptversuch: Uesen, Tag 0



b) Hauptversuch: Uesen, Tag 56, 1000 mg Tetrazyklin/kg Boden

Abbildung 34: T-RFLP Muster der Struktur der bakteriellen Lebensgemeinschaft im Boden Uesen zu Beginn der Inkubationsversuche (a) und nach 56 Tagen (b). Auf der X-Achse ist die Fragmentlänge (bp) dargestellt, auf der Y-Achse die Signalintensität (Fluoreszenz).

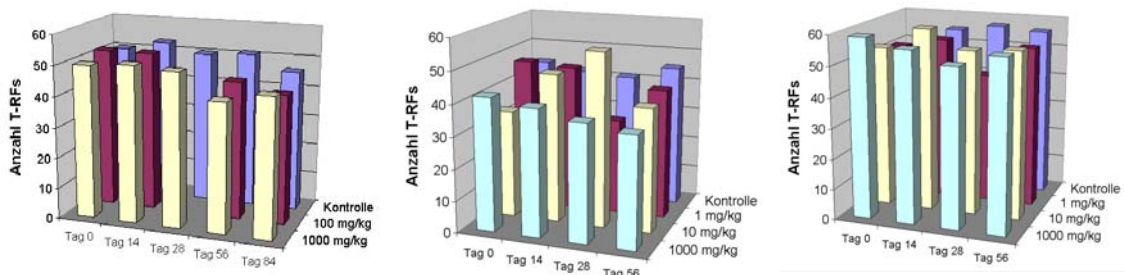
Zur Analyse ausgewählter Bakteriengruppen mussten spezifische Primer verwendet werden. Es zeigt sich in den Abbildungen 32 - 34, dass mit der T-

RFLP Methode während der Inkubation mit Tetrazyklinen keine dramatischen Veränderungen detektiert werden konnten.

Die Anzahl der terminalen Restriktionsfragmente aus den T-RFLP Analysen sind sowohl in tabellarischer (Tab. 23) wie auch grafischer Form (Abb. 35) wiedergegeben.

Bei dem Vorversuch 2 Grönheimer Feld ohne Rinderdung tritt bei den Ansätzen mit Tetrazyklinen verglichen mit der Kontrolle nach 56 Tagen eine leichte Reduzierung der Anzahl der terminalen Restriktionsfragmente auf. Der Ansatz mit der höchsten Tetrazyklin-Konzentration zeigt dabei die größte Reduzierung. Dieser Trend ist nur schwer zu bewerten, da es bei den Mustern der folgenden Probenahme (84 Tage) wieder zu einer Angleichung der Anzahl aller Peaks kommt.

Bei dem Hauptversuch mit den Böden Dinklage und Uesen kann keine Aussage über eine mögliche Korrelation zwischen Antibiotikamenge und Auswirkung auf die Anzahl der terminalen Restriktionsfragmente getroffen werden, da die Variation zwischen den Werten zu Beginn der Inkubation genauso groß war wie die Variation zwischen den unterschiedlichen Ansätzen.



Vorversuch 2: Grönheimer
Feld, ohne Rinderdung

Hauptversuch: Dinklage

Hauptversuch: Uesen

Abbildung 35: Anzahl aller Fragmente pro T-RFLP-Muster für die Versuche mit Boden aus Grönheimer Feld, Dinklage und Uesen. Angegeben ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Stichproben.

Tabelle 23: Anzahl aller terminaler Restriktionsfragmente pro T-RFLP Muster für die Versuche mit Boden aus Grönheimer Feld, Dinklage und Uesen. Angegeben ist der Mittelwert (\pm Standardabweichung) aus drei unabhängigen Stichproben.

Vorversuch 2: Grönheimer Feld, ohne Rinderdung					
Ansatz	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 56	Tag 84
Kontrolle	$50 \pm 3,1$	$53 \pm 2,6$	$50 \pm 3,2$	$51 \pm 2,0$	$46 \pm 1,5$
100 mg Tet/kg	$52 \pm 3,1$	$52 \pm 5,0$	n.b.	$45 \pm 1,7$	$42 \pm 9,5$
1000 mg Tet/kg	$50 \pm 1,0$	$51 \pm 1,7$	$50 \pm 2,5$	$42 \pm 9,1$	$45 \pm 3,2$
Hauptversuch: Dinklage					
Ansatz	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 56	
Kontrolle	$44 \pm 2,9$	$42 \pm 4,4$	$41 \pm 0,7$	$45 \pm 2,0$	
1 mg Tet/kg	$47 \pm 1,0$	$46 \pm 4,0$	$30 \pm 3,6$	$41 \pm 6,1$	
10 mg Tet/kg	$34 \pm 7,5$	$47 \pm 1,0$	$55 \pm 3,5$	$39 \pm 5,7$	
1000 mg Tet/kg	$42 \pm 3,6$	$40 \pm 3,1$	$37 \pm 6,1$	$35 \pm 4,4$	
Hauptversuch: Uesen					
Ansatz	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 56	
Kontrolle	$40 \pm 7,8$	$55 \pm 4,5$	$57 \pm 3,5$	$56 \pm 3,5$	
1 mg Tet/kg	$51 \pm 5,1$	$54 \pm 8,5$	$43 \pm 2,9$	$53 \pm 2,1$	
10 mg Tet/kg	53 ± 0	$60 \pm 2,1$	$54 \pm 0,6$	$55 \pm 4,0$	
1000 mg Tet/kg	$59 \pm 1,7$	$56 \pm 5,7$	$52 \pm 3,8$	$56 \pm 5,7$	

5.4 Bodenmikrobielle Aktivität

Wie schon in der Einleitung erwähnt sollten in dieser Studie neben Verbreitung und Persistenz von Tetrazyklinresistenz in Böden auch ihre Auswirkung auf die bodenmikrobielle Aktivität untersucht werden. Der Einfluss von Tetrazyklin auf die bodenmikrobielle Aktivität wurde exemplarisch anhand der Bodenatmung und der potentiellen Nitrifikationsleistung untersucht. Es wurden jeweils drei Parallelmessungen durchgeführt. Die gewählten Biotests erfassen wichtige Funktionen der Bodenmikroorganismen hinsichtlich der Nährstoffkreisläufe in ihrem natürlichen Substrat und in ihrer natürlichen Populationszusammensetzung (Fairbrother et al. 1999) und werden von der DECHEMA

(2001) zur Prüfung auf Bioverfügbarkeit und Beeinträchtigung von terrestrischer Organismen durch Schadstoffe empfohlen.

5.4.1 Methodik

Bestimmung der Bodenatmung

Die Atmung wurde nach der Richtlinie ISO DIS 17155 im Sapromaten (BSB-Meßgerät) bestimmt. Dabei werden die Basalatmung (Sauerstoffverbrauch ohne zusätzliche Nährstoffzugabe) und die substratinduzierte Atmung (SIR - Sauerstoffverbrauch nach Zugabe eines Nährstoffgemischs) nacheinander am selben Boden gemessen.

Für die Bestimmung der Basalatmung wurden drei Parallelen à 100 g TG der Probe als feuchter Boden für fünf Tage bei 20 °C inkubiert. Die Respirationsskurve wurde durch die kontinuierliche Messung der O₂-Aufnahme erstellt. Zur Messung der substratinduzierten Atmung wurde im Anschluss an die 5-tägige Messung der Basalatmung 1 g eines Glukosegemischs [Glukose-Monohydrat (88g) + (NH₄)₂SO₄ (13 g) + KH₂PO₄ (2 g)] als Substrat zugesetzt und die Messung der O₂-Aufnahme fortgesetzt, bis eine exponentielle Phase eindeutig erkennbar war. Die Auswertung der Basalatmung erfolgte nach 90 - 120 Stunden. Für die Auswertung der substratinduzierten Atmung wurde der lineare Bereich der Sauerstoffaufnahmekurve vor Eintreten der exponentiellen Phase herangezogen. Die exponentielle Phase charakterisiert das Wachstum der Mikroorganismen. Im Hauptversuch wurde nur die SIR gemessen. Das Glukosegemisch wurde in diesem Fall sofort zugesetzt.

Bestimmung der potentiellen Nitrifikationsleistung

Die potentielle Nitrifikationsleistung wurde nach der Richtlinie ISO DIS 15685 als potentielle Ammoniumoxidation bestimmt. Die Methode basiert auf der Bildung von Nitrit aus Ammoniumsulfat, wobei der Zusatz von Natriumchlorat die Weiteroxidation des Nitrits zu Nitrat hemmt.

Es wurden drei Parallelen à 25 g der Probe (Trockengewicht) in 100 ml-Erlenmeyerkolben gefüllt, mit 100 ml Substratlösung versetzt, kurz mit der Hand geschüttelt und anschließend in einem Inkubationsschüttler bei 25 °C inkubiert. Die Probenahme erfolgte nach zwei und sechs Stunden. Aus der Suspension wurden 10 ml entnommen, diese sofort mit 10 ml Kaliumchlorid-Lösung versetzt und anschließend über einen Faltenfilter filtriert.

Für die Analyse des Nitrits wurden 5 ml des Filtrats mit 3 ml NH_4Cl -Puffer und 2 ml Farbreagenz versetzt, geschüttelt und die Absorption nach 15 min bei 530 nm am Photometer erfasst.

Als Maß für die potentielle Ammoniumoxidation dient die von einem Gramm Boden abgegebene Menge an $\text{NO}_2\text{-N}$ ($\mu\text{g N} \cdot \text{g TM}^{-1}$), die durch die Differenz des Nitrit-N-Gehalts nach sechs und nach zwei Stunden gebildet und durch die Zeit (4 h) dividiert wurde.

5.4.2 Ergebnisse und Auswertung

A. Vorversuch 1

Bodenatmung

Bei den eingesetzten TC-Konzentrationen im Vorversuch 1 konnten keine eindeutigen konzentrationsabhängigen Effekte auf Basalatmung und substratinduzierte Atmung (SIR) festgestellt werden. Die Messungen der Proben von Tag 0 und 7 zeigen keine Unterschiede zu den Kontrollansätzen (Tabelle 24). Tendenziell zeigt sich nach 28 Tagen eine Stimulation der Bodenatmung in Abhängigkeit zur eingesetzten TC-Konzentration, auch wenn sich statistisch nur die Ansätze $\geq 0,1$ mg TC/kg Boden von denen $< 0,1$ mg TC/kg Boden (Basalatmung) bzw. ≥ 1 mg TC/kg Boden von denen < 1 mg Tetrazyklin/kg Boden (SIR) unterscheiden (*Mann-Whitney-U-Test*, $p \leq 0,05$).

Tabelle 24: Vorversuch 1. Atmungsaktivität ($\text{mg O}_2 \cdot 100\text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) in Grönheimer Feld Boden (GF) in Abhängigkeit zur Tetrazyklinkonzentration. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. 1 = ohne Tetrazyklin; 2 = 0,01 mg Tetrazyklin/kg Boden; 3 = 0,1 mg Tetrazyklin/kg Boden; 4 = 1 mg Tetrazyklin/kg Boden; 5 = 10 mg Tetrazyklin/kg Boden. Von jeder Bodenprobe wurden 3 Stichproben untersucht.

Basalatmung ($\text{mg O}_2 \cdot 100\text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)						
Ansatz	Tag 0		Tag 7		Tag 28	
GF 1	0,056	$\pm 0,005$	0,048	$\pm 0,001$	0,128	$\pm 0,004$
GF 2	0,061	$\pm 0,010$	0,054	$\pm 0,001$	0,134	$\pm 0,006$
GF 3	0,055	$\pm 0,004$	0,043	$\pm 0,005$	0,146	$\pm 0,004$
GF 4	0,057	$\pm 0,003$	0,049	$\pm 0,004$	0,151	$\pm 0,008$
GF 5	0,053	$\pm 0,008$	0,055	$\pm 0,006$	0,156	$\pm 0,009$
Substratinduzierte Atmung ($\text{mg O}_2 \cdot 100\text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)						
Ansatz	Tag 0		Tag 7		Tag 28	
GF 1	0,561	$\pm 0,012$	0,508	$\pm 0,003$	0,697	$\pm 0,022$
GF 2	0,572	$\pm 0,030$	0,537	$\pm 0,024$	0,732	$\pm 0,012$
GF 3	0,552	$\pm 0,001$	0,537	$\pm 0,048$	0,757	$\pm 0,042$
GF 4	0,595	$\pm 0,014$	0,480	$\pm 0,024$	0,801	$\pm 0,001$
GF 5	0,520	$\pm 0,014$	0,451	$\pm 0,031$	0,870	$\pm 0,073$

Potentielle Ammoniumoxidation

Bei der potentiellen Ammoniumoxidation konnte im Vorversuch 1 zu keinem Probenahmezeitpunkt ein antibiotikabedingter Effekt festgestellt werden (Tabelle 25). Die Werte aller Testansätze sind mit den jeweiligen Kontrollen vergleichbar (*Mann-Whitney-U-Test*, $p > 0,05$).

Das Fehlen einer konzentrationsabhängigen inhibierenden Wirkungen auf die mikrobielle Aktivität könnte durch die Vorbehandlung des „Grönheimer Feld“ Bodens mit Chlortetrazyklin (4 µg/kg Boden Vorbelastung) erklärt werden. Ein anfänglicher Einbruch nach Applikation des Antibiotikums bleibt aus, da die mikrobielle Population schon an Tetrazykline adaptiert ist. Andere Gründe könnten sein, dass die eingesetzte Antibiotikakonzentration generell – oder zumindest bei adaptierten Populationen – zu gering war um eine Wirkung zu erzielen bzw. dass die Aktivität der Mikroorganismen in den gewählten Böden generell zu gering war.

Aufgrund der fehlenden Inhibition wurden in Vorversuch 2 höhere Tetrazyklinkonzentrationen eingesetzt und zusätzlichen Parallelen Rinderdung appliziert um die Mikroorganismen zu stimulieren.

Tabelle 25: Vorversuch 1. Potentielle Ammoniumoxidation ($\text{ng NO}_2\text{-N} \cdot \text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) in Grönheimer Feld Boden (GF) in Abhängigkeit zur Tetrazyklinkonzentration. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. 1 = ohne Tetrazyklin; 2 = 0,01 mg Tetrazyklin/kg Boden; 3 = 0,1 mg Tetrazyklin/kg Boden; 4 = 1 mg Tetrazyklin/kg Boden; 5 = 10 mg Tetrazyklin/kg Boden. Von jeder Bodenprobe wurden 3 Stichproben untersucht.

Potentielle Ammoniumoxidation ($\text{ng NO}_2\text{-N} \cdot \text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)						
Ansatz	Tag 0		Tag 7		Tag 28	
GF 1	32,42	± 5,10	47,34	± 2,70	79,58	± 3,18
GF 2	37,10	± 2,76	55,16	± 13,20	89,18	± 6,84
GF 3	27,74	± 5,94	49,90	± 11,94	83,94	± 14,46
GF 4	37,10	± 2,04	59,94	± 23,64	84,68	± 5,88
GF 5	46,70	± 1,32	52,14	± 3,72	69,14	± 12,24

B. Vorversuch 2

Bodenatmung

Trotz höherer Tetrazyklinkonzentrationen im Vorversuch 2 konnten weder im Boden „Grönheimer Feld“ noch im Boden „Borstel“ eindeutige antibiotikaabhängige Effekte auf die Basalatmung festgestellt werden (Tabelle 26). Die Rinderdungapplikation führte bei beiden Böden unabhängig von der eingesetzten Tetrazyklinkonzentration zu einer Steigerung der Basalatmung.

Tabelle 26: Vorversuch 2. Basalatmung ($\text{mg O}_2 \cdot 100\text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) in Grönheimer Feld (GF) und Borstel Boden (B) in Abhängigkeit zur Tetrazyklinkonzentration und der Rinderdungapplikation. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. 1, 2 = ohne Tetrazyklin; 3, 4 = 5 (B) bzw. 100 mg (GF) Tetrazyklin/kg Boden; 5, 6 = 50 (B) bzw. 1000 mg (GF) Tetrazyklin/kg Boden. 1,3,5 = ohne Rinderdung; 2,4,6 = mit Rinderdung. Von jeder Bodenprobe wurden 3 Stichproben untersucht.

Basalatmung ($\text{mg O}_2 \cdot 100\text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)				
ohne Rinderdung				
Ansatz	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 56
GF 1	0.052 \pm 0.003	0.046 \pm 0.002	0.044 \pm 0.000	0.033 \pm 0.000
GF 3	0.051 \pm 0.003	0.042 \pm 0.000	0.044 \pm 0.008	0.032 \pm 0.000
GF 5	0.060 \pm 0.004	0.032 \pm 0.002	0.035 \pm 0.004	0.030 \pm 0.000
B 1	0.046 \pm 0.003	0.038 \pm 0.002	0.027 \pm 0.002	0.027 \pm 0.001
B 3	0.050 \pm 0.003	0.035 \pm 0.004	0.033 \pm 0.000	0.027 \pm 0.000
B 5	0.050 \pm 0.003	0.043 \pm 0.002	0.033 \pm 0.000	0.029 \pm 0.000
mit Rinderdung				
Ansatz	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 56
GF 2	0.192 \pm 0.016	0.234 \pm 0.042	0.190 \pm 0.033	0.069 \pm 0.003
GF 4	0.214 \pm 0.029	0.167 \pm 0.008	0.158 \pm 0.011	0.065 \pm 0.004
GF 6	0.189 \pm 0.012	0.182 \pm 0.046	0.172 \pm 0.002	0.081 \pm 0.008
B 2	0.165 \pm 0.008	0.172 \pm 0.004	0.109 \pm 0.000	0.087 \pm 0.005
B 4	0.195 \pm 0.001	0.136 \pm 0.015	0.113 \pm 0.028	0.063 \pm 0.006
B 6	0.172 \pm 0.046	0.145 \pm 0.002	0.128 \pm 0.010	0.062 \pm 0.001

Die substratinduzierte Bodenatmung (SIR) wurde in beiden Böden ohne Rinderdungapplikation in Abhängigkeit zur Antibiotikakonzentration gehemmt

(Tabelle 27). Während im Boden „Grönheimer Feld“ die Hemmung bis zum Versuchsende nach 56 d anhielt, konnte im Boden „Borstel“ nach 56 d kein Unterschied mehr zur Kontrolle festgestellt werden.

Die Rinderdungapplikation führte neben einer generellen Stimulation der SIR in beiden Böden zur Unterdrückung der tetrazyklinabhängigen Hemmung.

Tabelle 27: Vorversuch 2. Substratinduzierte Atmung ($\text{mg O}_2 \cdot 100\text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) in Grönheimer Feld (GF) und Borstel Boden (B) in Abhängigkeit zur Tetrazyklinkonzentration und der Rinderdungapplikation. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. 1, 2 = ohne Tetrazyklin; 3, 4 = 5 (B) bzw. 100 mg (GF) Tetrazyklin/kg Boden; 5, 6 = 50 (B) bzw. 1000 mg (GF) Tetrazyklin/kg Boden. 1,3,5 = ohne Rinderdung; 2,4,6 = mit Rinderdung. Von jeder Bodenprobe wurden 3 Stichproben untersucht.

Substratinduzierte Atmung ($\text{mg O}_2 \cdot 100\text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)				
ohne Rinderdung				
Ansatz	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 56
GF 1	0.713 \pm 0.031	0.596 \pm 0.140	0.599 \pm 0.040	0.531 \pm 0.060
GF 3	0.685 \pm 0.070	0.500 \pm 0.001	0.552 \pm 0.027	0.426 \pm 0.027
GF 5	0.519 \pm 0.024	0.366 \pm 0.033	0.396 \pm 0.043	0.335 \pm 0.015
B 1	0.599 \pm 0.001	0.422 \pm 0.037	0.468 \pm 0.009	0.365 \pm 0.001
B 3	0.541 \pm 0.037	0.414 \pm 0.018	0.459 \pm 0.002	0.350 \pm 0.029
B 5	0.422 \pm 0.023	0.324 \pm 0.035	0.426 \pm 0.015	0.348 \pm 0.026
mit Rinderdung				
Ansatz	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 56
GF 2	1.072 \pm 0.141	0.577 \pm 0.215	0.847 \pm 0.051	0.561 \pm 0.032
GF 4	0.843 \pm 0.063	0.322 \pm 0.036	0.680 \pm 0.096	0.544 \pm 0.010
GF 6	0.828 \pm 0.075	0.804 \pm 0.192	0.609 \pm 0.015	0.519 \pm 0.027
B 2	0.785 \pm 0.044	0.742 \pm 0.089	0.614 \pm 0.026	0.524 \pm 0.001
B 4	0.781 \pm 0.023	0.683 \pm 0.035	0.676 \pm 0.061	0.481 \pm 0.031
B 6	0.674 \pm 0.031	0.696 \pm 0.017	0.674 \pm 0.032	0.494 \pm 0.009

Potentielle Ammoniumoxidation

In Vorversuch 2 traten vereinzelte Effekte auf die potentielle Ammoniumoxidation durch eine Tetrazyklinapplikation auf. Im Borstel Boden mit

einer Konzentration von 50 mg Tetrazyklin pro kg Boden kam es zu Beginn des Versuchs zu einer Hemmung der potentiellen Ammoniumoxidation. Spätestens nach 28 Tagen war der Effekt verschwunden (Tab. 28). Die Rinderdungapplikation im Borstel Boden führte zu keinen Veränderungen der potentiellen Ammoniumoxidation.

Im Boden „Grönheimer Feld“ ohne Rinderdungapplikation konnten trotz deutlich höheren Tetrazyklinkonzentrationen keine eindeutigen konzentrationsabhängigen Effekte auf die potentielle Ammoniumoxidation festgestellt werden. In Versuchsansätzen mit Rinderdungapplikation hingegen traten bei der höchsten Tetrazyklinkonzentration (1000 mg Tet/kg Boden) deutliche Unterschiede zu den Kontrollansätzen auf. Die potentielle Ammoniumoxidation in der Kontrolle und dem 100 mg Tetrazyklin-Ansatz wurde durch die Rinderdungapplikation stimuliert. Die potentielle Ammoniumoxidation des 1000 mg Ansatzes unterschied sich dagegen nicht von der ungedüngten Variante.

Auch extrem hohe Tetrazyklinkonzentrationen wirken sich im Versuch kaum auf die potentielle Ammoniumoxidation und gar nicht auf die Basalatmung der Bodenmikroorganismen aus. Die substratinduzierte Atmung dagegen zeigt in diesem Bereich konzentrationsabhängige Hemmungen. Das kann durch die Wirkungsweise von Tetrazyklin erklärt werden. Das Antibiotikum hemmt die Proteinsynthese. Die Zugabe des Glucose-Nährstoffgemischs führt zu einer gesteigerten physiologischen Aktivität. Die Mikroorganismen bereiten sich auf Zellteilungen vor und benötigen dazu Proteinnachschub. Bleibt dieser aus wird auch die Atmungsaktivität wieder reduziert. Der Effekt ist bei reiner Ammoniumzugabe geringer, da Atmungsaktivität und Populationswachstum von Bodenmikroorganismen hauptsächlich Kohlenstoff limitiert sind.

Der organische Gehalt des Bodens hat einen deutlichen Einfluss auf die Tetrazyklinwirkung. Wie man beim Vergleich der Böden „Borstel“ und „Grönheimer Feld“ feststellt, senkt ein niedriger organischer Gehalt die Effektschwelle für Tetrazyklin.

Die Rinderdungapplikation führt zur Stimulation der mikrobiellen Aktivität und unterdrückt bzw. überdeckt in Abhängigkeit von der Tetrazyklinkonzentration

hemmende Wirkungen des Tetrazyklins. Dies kann zwei Gründe haben: a) Die Nährstoffapplikation führt zu einem Populationswachstum von tetrazyklinresistenten Mikroorganismen und b) das Antibiotikum sortiert an der zugeführten organischen Matrix.

Tabelle 28: Vorversuch 2. Potentielle Ammoniumoxidation ($\text{ng NO}_2\text{-N} \cdot \text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) in Grönheimer Feld (GF) und Borstel Boden (B) in Abhängigkeit zur TC-Konzentration und der Rinderdungapplikation. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. 1, 2 = ohne TC; 3, 4 = 5 (B) bzw. 100 mg (GF) TC/kg Boden; 5, 6 = 50 (B) bzw. 1000 mg (GF) TC/kg Boden. 1,3,5 = ohne Rinderdung; 2,4,6 = mit Rinderdung. Von jeder Bodenprobe wurden 3 Stichproben untersucht.

Potentielle Ammoniumoxidation (ng NO ₂ -N * g TM ⁻¹ * h ⁻¹)												
ohne Rinderdung												
Ansatz	Tag 0			Tag 14			Tag 28			Tag 56		
GF 1	42.84	±	6.84	45.74	±	27.48	56.84	±	6.18	51.38	±	6.72
GF 3	22.50	±	4.02	49.34	±	5.94	59.32	±	11.22	35.62	±	2.70
GF 5	38.82	±	18.96	71.78	±	15.42	56.28	±	11.76	34.98	±	7.80
B 1	55.54	±	10.32	68.04	±	11.88	37.20	±	3.24	33.75	±	4.74
B 3	68.62	±	12.42	54.88	±	4.20	36.78	±	7.14	47.25	±	5.88
B 5	47.66	±	7.14	40.76	±	8.40	34.56	±	6.18	33.39	±	1.98
mit Rinderdung												
Ansatz	Tag 0			Tag 14			Tag 28			Tag 56		
GF 2	59.22	±	15.60	73.58	±	5.52	93.54	±	8.94	68.53	±	6.84
GF 4	71.18	±	8.10	57.62	±	12.00	92.40	±	12.36	60.17	±	2.40
GF 6	46.22	±	20.52	60.30	±	10.56	40.24	±	6.60	53.72	±	8.28
B 2	60.50	±	13.02	69.60	±	11.82	37.50	±	5.28	42.18	±	8.16
B 4	71.10	±	8.58	47.42	±	6.96	44.38	±	8.76	47.81	±	8.34
B 6	31.34	±	5.16	28.02	±	9.66	40.10	±	7.32	44.60	±	3.12

Ein Anstieg der Zahl resistenter Mikroorganismen wurde in den molekularbiologischen Untersuchungen nicht bestätigt. Somit scheint die Sorption des Antibiotikums – und somit die schlechte Bioverfügbarkeit – der Grund für die Ergebnisse zu sein. Dies unterstützt auch die Aussagen

hinsichtlich des Bodenvergleichs „Grönheimer Feld“ - „Borstel“ und den gefundenen Abhängigkeiten zum organischen Gehalt der Böden.

Aufgrund fehlender Auswirkungen auf die Basalatmung wurde im Hauptversuch nur noch die SIR zur Erfassung der Atmungsaktivität untersucht. Wegen der unterdrückten bzw. überdeckten Tetrazyklineffekte bei Rinderdungapplikation, wurde im Hauptversuch auf die Dungapplikation verzichtet.

C. Hauptversuch

Bodenatmung

Unabhängig davon, ob der eingesetzte Boden unbelastet oder an Tetrazyklin adaptiert war, antibiotikaabhängige Effekte auf die substratinduzierte Atmung (SIR) konnten nur bei der höchsten applizierten Tetrazyklinmenge (1000 mg/kg) festgestellt werden (Tabelle 29).

Im Kontrollboden „Uesen“ wurde die SIR sofort nach Applikation des Antibiotikums gehemmt (31 %, *Mann-Whitney-U-Test*, $p \leq 0,01$). Diese Hemmung blieb über alle Beprobungstermine bis zum Versuchsende bestehen (20 – 27 %, $p \leq 0,001$). Der adaptierte Boden „Dinklage“ zeigte die Hemmung ebenfalls. Diese war aber schwächer (8 – 18 %, $p \leq 0,05$) und wurde erst nach 14 d detektiert. Auch hier blieb die Hemmung bis zum Versuchsende bestehen (Abb. 36).

Tabelle 29: Hauptversuch. Substratinduzierte Atmung ($\text{mg O}_2 \cdot 100\text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) in Dinklage (D) und Uesen Boden (U) in Abhängigkeit zur Tetrazyklinkonzentration. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. 1 = ohne Tetrazyklin; 3 = 10 mg Tetrazyklin/kg Boden. 4 = 1000 mg Tetrazyklin/kg Boden. Von jeder Bodenprobe wurden 3 Stichproben untersucht.

Substratinduzierte Atmung ($\text{mg O}_2 \cdot 100\text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)				
Ansatz	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 56
D 1	0.40 \pm 0.02	0.40 \pm 0.02	0.37 \pm 0.00	0.38 \pm 0.03
D 3	0.43 \pm 0.03	0.41 \pm 0.03	0.39 \pm 0.03	0.42 \pm 0.01
D 4	0.40 \pm 0.03	0.33 \pm 0.00	0.33 \pm 0.00	0.35 \pm 0.02
U 1	0.80 \pm 0.05	0.78 \pm 0.03	0.71 \pm 0.00	0.69 \pm 0.01
U 3	0.83 \pm 0.04	0.79 \pm 0.08	0.70 \pm 0.03	0.82 \pm 0.02
U 4	0.55 \pm 0.02	0.57 \pm 0.03	0.54 \pm 0.00	0.55 \pm 0.01

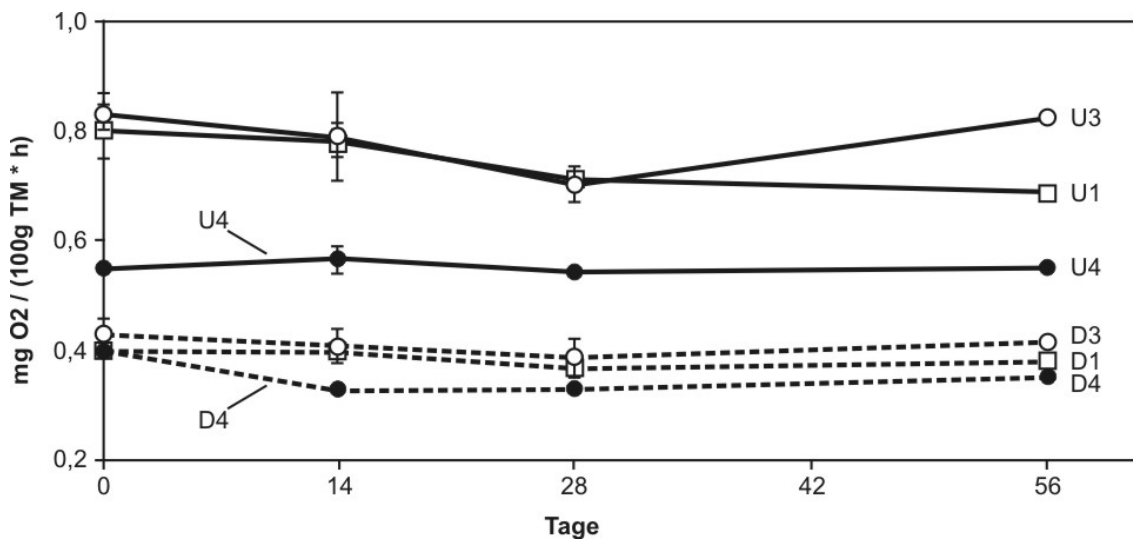


Abbildung 36: Hauptversuch. Substratinduzierte Atmung ($\text{mg O}_2 \cdot 100\text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) in Dinklage (D) und Uesen Boden (U) in Abhängigkeit zur Tetrazyklinkonzentration. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. 1 = ohne Tetrazyklin; 3 = 10 mg Tetrazyklin/kg Boden. 4 = 1000 mg Tetrazyklin/kg Boden. Von jeder Bodenprobe wurden 3 Stichproben untersucht.

Potentielle Ammoniumoxidation

Bei der potentiellen Ammoniumoxidation wurden ähnliche Tendenzen wie bei der SIR festgestellt. Unabhängig davon, ob der eingesetzte Boden unbelastet oder an Tetrazyklin adaptiert war, konnten antibiotikaabhängige Effekte auf die potentielle Ammoniumoxidation nur bei der höchsten applizierten Tetrazyklinmenge (1000 mg/kg) festgestellt werden (Tabelle 30).

Tabelle 30: Hauptversuch. Potentielle Ammoniumoxidation ($\text{ng NO}_2\text{-N} \cdot \text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) in Dinklage (D) und Uesen Boden (U) in Abhängigkeit zur Tetrazyklinkonzentration. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. 1 = ohne Tetrazyklin; 3 = 10 mg Tetrazyklin/kg Boden. 4 = 1000 mg Tetrazyklin/kg Boden. Von jeder Bodenprobe wurden 3 Stichproben untersucht.

Potentielle Ammoniumoxidation (ng NO ₂ -N * g TM ⁻¹ * h ⁻¹)															
Ansatz	Tag 0				Tag 14				Tag 28			Tag 56			
D 1	32.94	±	2.88		27.20	±	0.77		38.60	±	5.66		28.76	±	5.37
D 3	29.14	±	2.41		23.76	±	2.81		21.52	±	1.97		30.42	±	20.95
D 4	40.28	±	3.48		29.16	±	2.97		26.84	±	3.95		12.34	±	1.99
U 1	59.16	±	9.33		62.84	±	0.47		61.92	±	4.11		60.10	±	10.70
U 3	64.58	±	1.59		64.72	±	3.00		66.00	±	5.51		53.48	±	10.91
U 4	40.42	±	12.09		56.88	±	2.49		71.04	±	3.55		49.32	±	14.59

Im Kontrollboden „Uesen“ wurde die potentielle Ammoniumoxidation sofort nach Applikation des Antibiotikums gehemmt (32 %, *Mann-Whitney-U-Test*, $p \leq 0,05$). Diese Hemmung reduzierte sich über Tag 14 (9 %, $p \leq 0,05$) und war nach 28 d verschwunden. Der adaptierte Boden „Dinklage“ zeigte ebenfalls eine Hemmung der potentiellen Ammoniumoxidation. Während die Aktivität im Kontrollansatz über die gesamte Versuchsdauer relativ konstant blieb, konnte im 1000 mg-Tetrazyklin-Ansatz eine kontinuierlich sinkende Aktivität festgestellt werden. Statistisch signifikant sind die Effekte gegenüber der Kontrolle aber mit Hemmungen von 34 – 57 % erst nach 28 d ($p \leq 0,05$, Abb. 37).

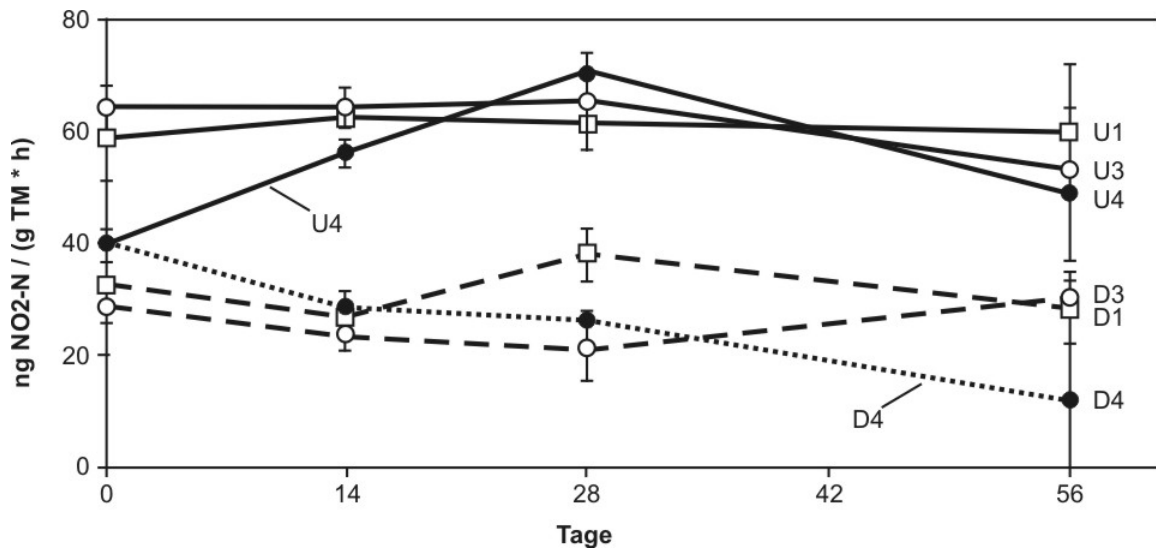


Abbildung 37: Hauptversuch. Potentielle Ammoniumoxidation ($\text{mg NO}_2\text{-N} \cdot 100\text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) in Dinklage (D) und Uesen Boden (U) in Abhängigkeit zur Tetrazyklinkonzentration. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. 1 = ohne Tetrazyklin; 3 = 10 mg Tetrazyklin/kg Boden. 4 = 1000 mg Tetrazyklin/kg Boden. Von jeder Bodenprobe wurden 3 Stichproben untersucht.

In dem Ansatz mit 10 mg TC pro kg Boden treten an Tag 28 signifikant niedrigere Werte auf als in der Kontrolle. Dies spiegelt aber keine Tendenz wider und kann mit besonders hohen Werten zu diesem Zeitpunkt in der Kontrolle erklärt werden. An Tag 56 können keine Unterschiede mehr zur Kontrolle festgestellt werden.

6 Zusammenfassende Diskussion und Bewertung der Ergebnisse

Die Wirkstoffleitgruppen Tetrazykline und Sulfonamide werden in großem Umfang in der Veterinärmedizin eingesetzt. Über die in den Ausscheidungen anfallenden Mengen und mögliche Umweltwirkungen der Antibiotika ist derzeit wenig bekannt. Dieses Forschungsvorhaben hatte daher zum Ziel, das Ausscheidungsverhalten und die Persistenz von Tetrazyklin in Masthähnchenfestmist sowie die Mobilität von Tetrazyklin und Sulfadiazin in unterschiedlichen Böden zu untersuchen. Zusätzlich wurde ein Screening von anonymen Gülleproben bzw. Proben mit bekanntem Wirkstoffeinsatz durchgeführt, um Anhaltspunkte über die tatsächliche Belastung der Wirtschaftsdünger in der Praxis zu erhalten. Ein weiteres Teilvorhaben innerhalb dieses Forschungsprojektes beschäftigte sich mit der Resistenzentwicklung sowie der mikrobiellen Aktivität unter dem Einfluss von Tetrazyklin im Boden.

TEILVORHABEN 1

Ausscheidung von oral verabreichtem Tetrazyklin durch Masthähnchen

Während der TC-Verabreichung war bei beiden gewählten Dosierungen (0,5 bzw. 1,0 g TC/kg Futter) ein stetiger Anstieg der TC-Konzentration in den Ausscheidungen der Masthähnchen zu verzeichnen. Bei konstantem TC-Gehalt im Futter, aber mit dem Lebensalter steigender Futteraufnahme und damit vermehrter TC-Aufnahme, erfolgte die höchste TC-Ausscheidung in den letzten 3 der 10 Behandlungstage. Obwohl die höher mit TC versorgten Tiere die doppelte TC-Dosis erhalten hatten, lag die Ausscheidung des Wirkstoffes nicht im gleichen Verhältnis höher. Diese Beobachtung konnte auch bei Untersuchungen zur TC-Ausscheidung bei Mastschweinen gemacht werden (Grafe 2001). Möglicherweise ist dieser Effekt durch eine verstärkte

Metabolisierung der Hauptsubstanz oder aber eine Anreicherung im Organismus (z.B. Knochen; Kühne et al. 2001) zu erklären.

Anhand der vorliegenden Daten ist keine Aussage über den tatsächlichen Anteil des ausgeschiedenen Wirkstoffs an der insgesamt aufgenommenen Menge möglich. Die regelmäßige, zum Beispiel tägliche Mistbeprobung wäre für eine Aussage über die maximale Konzentration bzw. Gesamtmenge an Tetrazyklin im Festmist direkt nach Applikationsende erforderlich gewesen, hätte allerdings für repräsentative Proben zu große Entnahmemengen bedeutet. Dagegen konnte die „Wiederfindungsrate“ am Ende der Mast abgeschätzt werden. Dazu wurden am Ende der Mastperiode (30 Tage) etwa 45 % des verabreichten Tetrazyklins wiedergefunden. Die Ausscheidungsraten für Tetrazyklin liegen jedoch in einer Größenordnung von 70 - 80 % (Kroker 1983, Winckler und Grafe 2000), so dass offensichtlich bereits während der Mastperiode (vermutlich mikrobielle) Abbauprozesse in der Mistmatte stattfinden.

Persistenz von Tetrazyklin in Masthähnchenfestmist

Im vorliegenden Versuch wurde angestrebt, die Persistenz von Tetrazyklin in praxisnahen Lagerungsvarianten zu testen, um eine Bewertungsgrundlage zu erhalten. Festmist aus der Geflügelmast wird häufig entweder direkt auf das Feld aufgebracht oder am Feldrand bzw. in befestigten Stallmistlagerstätten zwischengelagert. Dieser Mist wird meistens nicht umgesetzt, sondern über mehrere Wochen den natürlichen Witterungsbedingungen ausgesetzt. Letzteres konnte im Versuchsmaßstab nicht beachtet werden, da für eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse konstante Umgebungsbedingungen zum Beispiel für Temperatur und Feuchte notwendig waren. Unter Praxisbedingungen würde aus arbeitswirtschaftlichen Gründen ein Umsetzen des Festmists höchstens einmalig erfolgen. Daher wurde entschieden, in einer Lagerungsvariante den Festmist einmal nach 6 Wochen zu durchmischen und neu aufzuschichten.

Am Ende der dreimonatigen Lagerdauer wurden im Mist der niedrig dotierten Variante (0,5 g TC/kg) im Mittel noch 1,5 mg/kg TC nachgewiesen werden, dagegen enthielt die höher dotierte Variante (1,0 g TC/kg Futter) 24,6 mg/kg Tetrazyklin (2,2 bzw. 16,6 % der Ausgangskonzentration). Möglicherweise lag hier durch die höhere TC-Ausgangskonzentration bei der höher dosierten Variante eine Hemmung des mikrobiellen TC-Abbaus vor.

Während für Tetrazyklin in Schweinegülle Halbwertszeiten zwischen 45 und 105 Tagen ermittelt wurden (Winckler und Grafe 2000), zeigte Tetrazyklin im gelagerten Masthähnchenfestmist einen deutlich schnelleren Konzentrationsrückgang. Dies steht möglicherweise mit der Temperaturentwicklung im Miststapel im Zusammenhang, da der Temperaturanstieg in der initialen Periode (Tag 0: 22 °C; Tag 10: 55 °C) mit der stärksten Konzentrationsabnahme einherging.

Der oben beschriebene Temperaturanstieg war bei der am höchsten mit TC dotierten Variante zu Beginn der Lagerung leicht verzögert; die höchste Rottetemperatur wurde in den Kontrollbehältern erreicht. Möglicherweise wirkte sich also der TC-Gehalt negativ auf die an der Kompostierung beteiligten Mikroorganismen aus, so dass der Rotteprozess verzögert anlief.

Während des ersten Lagerungsmonats hatte auch die Lagerungsart einen Einfluss auf die Temperaturentwicklung im Festmist; in diesem Zeitraum lagen bei den aeroben Varianten geringfügig höhere Temperaturen als bei den anaeroben Varianten vor. Im späteren Verlauf der Lagerung war dieser Effekt dagegen nicht mehr zu erkennen. Bezüglich der Abbauvorgänge führten dagegen vergleichsweise anaerobe Bedingungen zu geringeren End-TC-Konzentrationen als bei aerober Lagerung.

Nachweis von Tetrazyklinen und Sulfonamiden in anonymen Schweinegülleproben

Für das anonyme Screening von Schweinegülleproben auf die Tetrazykline Oxytetracyklin, Tetrazyklin, Chlortetracyklin sowie die Sulfonamide Sulfadiazin

und Sulfamethazin standen insgesamt 176 Proben aus der Praxis zur Verfügung. Lediglich 12,5 % wiesen keine Rückstände oberhalb der Bestimmungsgrenzen auf. 5,1 % (OTC), 10,2 % (CTC) bzw. 49,4 % (TC) der Proben enthielten Tetrazykline mit durchschnittlichen Konzentrationen von 21,5, 6,2 bzw. 9,7 mg/kg. Sulfadiazin war in 48,9 % (MW: 4,9 mg/kg), Sulfamethazin in 48,3 % (MW: 7,0 mg/kg) der Proben nachweisbar. Grundsätzlich lag eine hohe Variabilität in den Wirkstoffgehalten vor. Die Häufigkeit positiver Befunde entspricht insgesamt dem praxisüblichen, verbreiteten Einsatz dieser Wirkstoffe, der bereits in früheren Studien belegt worden war (Winckler und Grafe 2000, Rassow und Schaper 1996). Die ermittelten Sulfonamidkonzentrationen unterschritten trotz vergleichbarer empfohlener Dosierung deutlich die Werte für Tetrazykline; dies deutet auf eine geringere Persistenz der Sulfonamide in Gülle hin.

Screening von Schweinegülleproben nach Einsatz eines Tierarzneimittels

Insgesamt 7 Schweinegülleproben standen für das Screening bei bekanntem Tierarzneimittelseinsatz (nach Angabe des Landwirtes) zur Verfügung. Obwohl alle Betriebe angegeben hatten, im betreffenden Zeitraum kein Tetrazyklin eingesetzt zu haben, konnte in 6 Proben Tetrazyklin in Konzentrationen von 1,5 bis 28,9 mg/kg nachgewiesen werden. Dies weist wiederum auf die ausgeprägte Persistenz von Tetrazyklin hin und lässt auf Güllerestbestände, die im Güllebehälter verblieben, schließen.

Alle anderen Wirkstoffe konnten wie angegeben bestätigt werden. Die ermittelten Konzentrationen decken sich in der Größenordnung mit den Werten aus der Screening-Untersuchung der anonymen Schweinegülleproben.

TEILVORHABEN 2

Mobilität von Tetrazyklin und Sulfadiazin im Gefäßversuch

Im Sickerwasser aus humosem Sandboden und lehmigem Schluff konnten nach Starkregensimulation 48 h nach Aufbringung tierarzneimittelhaltiger Gülle

weder Tetrazyklin noch Sulfadiazin oberhalb der Bestimmungsgrenze von 2 µg/l bzw. 6 µg/l nachgewiesen werden. Dagegen lag bei zwei von drei Gefäßen mit Nullerde (auf Torfbasis) in allen Sickerwasserfraktionen Tetrazyklin in Spuren vor (1,6 - 8,2 mg/l). Warum TC nur im Sickerwasser von zwei Gefäßen gefunden werden konnte, kann derzeit nicht erklärt werden.

Bei Berechnung nach 10 Wochen konnten dagegen unabhängig von der Bodenart weder Tetrazyklin noch Sulfadiazin im Sickerwasser nachgewiesen werden.

Ursache für das Auftreten von TC im Sickerwasser beim Torfgemisch ist vermutlich der hohe Torfanteil der Nullerde. Dieser bedingt aufgrund seiner groben Struktur einen erhöhten Grobporenanteil im Boden. Dies ermöglichte unter Umständen eine Verlagerung nicht nur von Wasser sondern auch von Güllebestandteilen, an denen Tetrazyklin anhängig war. Sithole und Guy (1987) wiesen nach, dass die Bindung von Antibiotika zu gelöstem organischen Material stärker ist als zu festen Bodenbestandteilen. Begleitende Untersuchungen des Ammonium-N- oder Phosphor-Gehalts zur Abschätzung eines Grobporenflusses konnten aufgrund des geringen Probenvolumens nicht durchgeführt werden.

Einen weiteren Erklärungsansatz liefert der erhöhte Humus- und fehlende Tonanteil in der Nullerde. Tetrazyklin lagert sich unterschiedlich stark an Tonmineralien und Humusbestandteile an (Tolls 2001; Rabølle und Spliid 2000; Sithole und Guy 1987). Nullerde hat eine vergleichsweise hohe Kationenaustauschkapazität (KAK), die offensichtlich durch den hohen Humus- und Strukturanteil hervorgerufen wird. Unter Umständen aber sind die Bindungskräfte zwischen Tetrazyklin und den Humusbestandteilen weniger stabil als die Bindungen, die mit Tonmineralien eingegangen werden. Dies könnte erklären, warum sich im humosen Sand und lehmigem Schluff trotz deutlich geringerer KAK kein Tetrazyklin verlagert hat, im Torfgemisch trotz hoher KAK jedoch TC ausgewaschen wurde.

Weiterhin ist ein Zusammenhang zwischen Calciumgehalt des Bodens und TC-Verlagerung denkbar. Das Torfgemisch hat einen etwa 10fach höheren Calciumgehalt als die anderen verwendeten Böden. Tetrazyklin bildet Chelatkomplexe mit Calcium (Kroker 1996) und könnte so bei der Auswaschung von Calcium mit dem Sickerwasser (Scheffer und Schachtschabel 1992) durch den Boden transportiert werden.

Nach dem frühen Starkregenereignis (48 h) lagen generell im Oberboden höhere Wirkstoffmengen vor als im Unterboden. Die Gehalte schwankten jedoch sehr stark zwischen den Bodenarten und waren offensichtlich vom Tongehalt des Bodens abhängig (lehmiger Schluff > humoser Sand > Nullerde). Grundsätzlich lagen die Sulfadiazinkonzentrationen nach 48h bei gleicher Applikationsmenge um ein Vielfaches unter denen des Tetrazyklins.

10 Wochen später waren für beide Wirkstoffe deutlich geringere Konzentrationen im Boden nachweisbar. Der Rückgang der Gehalte im Vergleich zum Starkregenereignis nach 48 h bewegte sich bei Tetrazyklin etwa um den Faktor 10, bei Sulfadiazin im Mittel um den Faktor 7. Nach wie vor war aber für Tetrazyklin im Oberboden eine deutlich höhere Wirkstoffmenge zu finden als im Unterboden. Dies deutet einerseits auf einen Abbau und andererseits auf eine geringe Verlagerungsneigung der Wirkstoffe hin.

Insgesamt belegen die Ergebnisse, dass Sulfadiazin im Boden sehr viel weniger stabil ist. Trotz potenzieller Mobilität aufgrund geringer Sorptionsneigung an feste Bodenbestandteile (Tolls 2001) unterliegt Sulfadiazin eventuell stärkeren Abbauvorgängen (Boxall et al. 2002). Langhammer (1989) hatte bereits den raschen Abbau eines Sulfonamids in Gülle nachgewiesen.

Tetrazyklin zeigte dagegen zumindest in sandigen und lehmigen Böden eine ausgeprägte Stabilität im Boden sowie eine geringe Verlagerungsneigung. Damit werden die Untersuchungen von Rabølle und Spliid (2000), Höper et al. (2002) sowie Hamscher et al. (2002) bestätigt. Eine höhere

Verlagerungsneigung in Moorböden, eventuell gebunden an Güllebestandteile, kann dagegen nicht ausgeschlossen werden.

Mobilität von Tetrazyklin und Sulfadiazin im Lysimeter

Im ersten Untersuchungsjahr wurde in 4 Sickerwasserproben unter Mais - aber nicht unter Roggen - Tetrazyklin in einer Konzentration von mehr als 1 µg/l nachgewiesen. Dieser Befund ließ sich im zweiten Durchgang 2002 jedoch nicht reproduzieren. Das im zweiten Versuchsjahr zusätzlich eingesetzte Sulfadiazin war weder unter Mais noch unter Roggen nachweisbar.

Damit liegen zumindest für das Lysimetermodell erstmals Hinweise auf eine Verlagerbarkeit von Tetrazyklin vor. Die betroffenen Lysimeter waren jeweils mit humosem Sand unterschiedlicher Herkunft befüllt. Die positiven Tetrazyklin-Befunde unter Mais traten in den ersten vier Wochen nach Gülleapplikation bei relativ geringem Sickerwasserfluss auf. Anhand von Analysen durch ein Referenzlabor (Bestimmungsgrenze 0,1 µg/l) konnte jedoch weitgehend ausgeschlossen werden, dass zu Probenahmezeitpunkten mit höherem Sickerwasseranfall eine mit der verwendeten Nachweismethode nicht detektierbare TC-Auswaschung (Verdünnungseffekt) stattfand.

Während unter Roggen, bei dem die Gülle nur oberflächlich aufgebracht wurde, kein Tetrazyklin im Sickerwasser nachgewiesen werden konnte, war dies unter Mais, bei dem die Gülle etwa 4 cm tief in den Boden eingearbeitet wurde, der Fall. Es ist jedoch gleichzeitig denkbar, dass die betroffenen Lysimeter mehr Grobporen (Wurzelbahnen, Wurmgänge etc.) enthalten und dies die Verlagerung von Gülle- oder Bodenpartikeln, an denen Tetrazyklin haftet, begünstigte. Ein Makroporenfluss wurde auch für den Nachweis von *E. coli* in unteren Bodenhorizonten und im Sickerwasser unter güllegedüngten Böden (Rahe et al. 1978) oder die Verlagerung von Pestiziden und Herbiziden (McGechan und Lewis 2002; Strebe und Talbert 2001) angenommen. Die Schlussfolgerung, dass die Einarbeitung von Gülle in den Boden das

Auswaschen von Tetrazyklin begünstigt, kann daher zu diesem Zeitpunkt nicht gezogen werden.

Dagegen war keine Dosisabhängigkeit auf das Auftreten oder die Höhe der Auswaschung ableitbar (Dosis der „positiven“ Lysimeter: 22,5 bis 134,6 mg TC).

Im Hinblick auf eine realistische Risikobewertung muss berücksichtigt werden, dass es sich im vorliegenden Vorhaben um anthropogen beeinflusste Modelle handelt. Auch in so großen Bodenkörpern wie Lysimetern können die Bodenverhältnisse im Feld nur unvollständig nachgeahmt werden. Weiterhin handelt es sich bei den detektierten TC-Gehalten im Sickerwasser um sehr geringe Konzentrationen. So macht beispielsweise bei Lysimeter 13 der Anteil des detektierten Tetrazyklins (3,1 µg/l bei 1,45 l Sickerwasseranfall) an der Aufbringungsmenge (67,2 mg TC) lediglich 0,06 ‰ aus. Darüber hinaus war unter gewachsenen Böden auch mit hochempfindlichen Nachweisverfahren bisher kein Nachweis von Tetrazyklinen in mittels Saugkerzen gewonnenem Bodenwasser oder in oberflächennahem Grundwasser möglich (Höper et al. 2002). Das Auswaschungsrisiko unter Praxisbedingungen ist daher als sehr gering einzuschätzen.

Die wiederholte Untersuchung des Lysimeterbodens auf Tetrazyklin bzw. Sulfadiazin ergab über die beiden Untersuchungsjahre einen Anstieg des Wirkstoffgehaltes im Boden. Im Herbst 2002 lag die TC-Konzentration deutlich höher (bis 80 µg/kg) als noch im Herbst 2001 (< 40 µg/kg) nach erneuter Güllegabe im Frühjahr 2002. Es erfolgte demnach nur ein unvollständiger Abbau; dieser Effekt war unabhängig von Boden- oder Fruchtart.

Sulfadiazin erreichte nach Applikation über Gülle wesentlich geringere Konzentrationen im Boden als Tetrazyklin und wurde über den Probennahmezeitraum deutlich abgebaut. Dies bestätigt die Befunde aus dem Gefäßversuch, wo Sulfadiazin ebenfalls in deutlich geringeren Konzentrationen

messbar war als Tetrazyklin. Sulfadiazin hat demnach eine geringere Persistenz in der Umwelt als Tetrazyklin.

Sowohl bei den Boden- (TC, SD) als auch den Sickerwasseruntersuchungen (TC) wurden zum Teil deutlich die sog. Triggerwerte der EMEA-Guideline für die Umweltbewertung von Tierarzneimitteln für Boden (100 µg/kg) bzw. Wasser (1 µg/l) überschritten, die weiterführende ökotoxikologische Untersuchungen (Phase II) einleiten. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass sich diese Triggerwerte auf vorhergesagte Umweltkonzentrationen (Predicted Environmental Concentrations, PEC) auf Basis von Worst-case-Szenarien beziehen. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden jedoch aus wissenschaftlichen Gründen teilweise deutlich über den in der landwirtschaftlichen Praxis zu erwartende Dosierungen eingesetzt. Daher ist keine direkte Übertragbarkeit der in diesem Forschungsvorhaben ermittelten Gehalte gegeben. Auf Grundlage von Praxisdaten und experimentell erarbeiteten Halbwertszeiten für TC in Schweinegülle hatten jedoch bereits Winckler und Grafe (2000) Triggerwertüberschreitungen für die PEC_{Boden} bei TC-Anwendung in der Schweinemast ermittelt.

TEILVORHABEN 3

In diesem Teilprojekt wurden Pilotversuche zur Etablierung, Verbreitung und Persistenz von Tetrazyklinresistenz in Böden und ihre Auswirkung auf die bodenmikrobielle Aktivität durchgeführt. Ausgesuchte Resistenzgene und die genomische Variabilität wurden mittels PCR bzw. T-RFLP-Analyse untersucht. Die mikrobielle Aktivität wurde beispielhaft über die Bodenatmung und die potenzielle Ammoniumoxidation bestimmt.

Die Effekte des Antibiotikums wurden in Abhängigkeit zur Konzentration (0,01 – 1000 mg Tetrazyklin pro kg Boden) und der zusätzlichen Einflussgrößen organischer Gehalt, Nährstoffgehalt und Vorbelastung des Bodens untersucht.

Generell kann gesagt werden, dass Effekte, wenn sie auftraten, nur bei nicht umweltrelevanten Nominalkonzentrationen nachzuweisen waren (je nach Boden 50 bzw. 1000 mg Tetrazyklin/kg Boden). In gedüngten Ackerböden liegen normalerweise Konzentrationen zwischen 30 µg/kg (Hamscher 2000) und 200 µg/kg (Boden „Dinklage“) vor. Die in der Studie eingesetzten Konzentrationen wurden gewählt, um anhand von Positiv-Kontrollen überhaupt tetrazyklinabhängige Effekte zu erfassen. Es ist bekannt, dass Tetrazykline mit K_D -Werten von 400 – 1000 sehr hohe Sorptionsfähigkeiten besitzen (Rabolle & Spliid 2000) und somit eine schlechte Bioverfügbarkeit aufweisen.

Keine der untersuchten Einflussgrößen hatte messbare Auswirkungen auf die Existenz bzw. die Menge von Tetrazyklin-Resistenzgenen der Klassen A, B, D, E, M, O, Q, S, T und W. Auch bei der Strukturuntersuchung mittels T-RFLP-Analyse konnten keine Effekte erkannt werden. Im Gegensatz dazu wurde die bodenmikrobielle Aktivität durch Tetrazyklin prinzipiell gehemmt. Die Effektschwelle für die Antibiotikawirkung war dabei von mehreren Parametern abhängig.

Der organische Gehalt des Bodens hat einen deutlichen Einfluss auf die Tetrazyklinwirkung. Ein hoher organischer Gehalt erhöht die Effektschwelle für Tetrazyklin. Während bei 0,9 % TOC-Gehalt im Boden die Atmungs- und Nitrifikationsaktivität schon bei einer Nominalkonzentration von 50 mg Tetrazyklin pro kg Boden gehemmt wird, treten diese inhibitorischen Effekte bei einem TOC-Gehalt des Bodens von 2,7 % erst ab einer Nominalkonzentration von 1000 mg Tetrazyklin pro kg Boden auf.

Die Applikation von Rinderdung führt zum Ausbleiben der hemmenden Wirkungen des Tetrazyklins. Das Zuführen der organischen Matrix führt zu einer Erhöhung der Effektschwelle für das Antibiotikum und unterdrückt somit die Wirkung im untersuchten Konzentrationsbereich. Die Effekte können über die Sorption des Tetrazyklins an die organische Matrix erklärt werden (Tolls 2001). Trotz extrem hoher Nominalkonzentrationen liegen in Böden mit hohem organischem Gehalt somit nur geringe bioverfügbare Mengen des Antibiotikums vor.

Die Agrarwirtschaft gilt als direkter Verursacher von Einbringung und Ausbreitung resistenter Stämme in die Umwelt (Chee-Sanford et al. 2001, Jensen et al. 2001). Trotzdem konnte in dieser Studie keine Adaptation der Bodenmikroorganismen durch Ausbildung bzw. Anreicherung von resistenten Stämmen aufgrund einer Tetrazyklinapplikation nachgewiesen werden. Dies gilt kurzfristig (Versuchsdauer) wie langfristig (Vergleich unbelasteter Boden mit vorbelastetem Boden). Feldversuche von Jensen et al. (2001) unterstützen diese Aussage.

Nachweis und Quantifizierung von Tetrazyklin-Resistenzgenen

Mit der PCR konnten spezifisch Tetrazyklin-Resistenzgene in Bodenproben detektiert werden. Dabei zeigte sich, dass auch in Proben, die nicht mit Tetrazyklin inkubiert waren, Tetrazyklin-Resistenzen existieren. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da sich die natürlichen, Antibiotika produzierenden Mikroorganismen selbst durch Antibiotika-Resistenzgene schützen. Diese Gene sind zum größten Teil (95 %) auf mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden und Transposons kodiert (Nwosu 2001). Diese genetischen Elemente können auch weit über Artgrenzen hinaus zwischen (Mikro-)Organismen ausgetauscht werden (Davison 1999). Dies sind die Gründe, warum nahezu in jedem Habitat – auch ohne externen Selektionsdruck – Mikroorganismen mit Antibiotika-Resistenzgenen gefunden werden. Dabei bleiben einmal erworbene Resistenzgene auch ohne Selektionsdruck für lange Zeit in den Organismen (bzw. im Genpool) erhalten (Salysers und Amabile-Cuevas 1997).

Während des Inkubationszeitraumes (bis zu 84 Tage) konnte keine eindeutige Korrelation von unterschiedlichen Tetrazyklinkonzentrationen (10 µg bis 1 g pro kg Boden) auf die Erhöhung an Tetrazyklin-Resistenzgenen gezeigt werden. Dies könnte zwei Ursachen haben: a) die Tetrazyklingaben führen nicht zu einer Erhöhung der Tetrazyklin-Resistenzgene im Boden oder b) auf Grund des räumlich eng begrenzten Auftretens von Resistenzen – gebunden an das Vorkommen resistenter Mikroorganismen – werden diese nicht ausreichend

detektiert. Für Möglichkeit b) spricht, dass Resistenzgene sporadisch über die Zeit gefunden werden. Um diese Einschränkung zu umgehen, müsste der gesamte Ansatz aufgearbeitet werden. Dies würde entweder einen starken Verdünnungseffekt zur Folge haben (Aufarbeiten großer Bodenmengen) oder die Versuche müssten in sehr kleinen Volumina durchgeführt werden (stark artifizielles System). Das Anreichern resistenter Keime auf Nährboden bzw. in Nährlösungen ist keine Alternative, da hierdurch ein Großteil der mikrobiellen Diversität (bis zu 99 %) nicht erfasst wird.

Ein wesentlicher Punkt bei der Durchführung so gearteter Versuche ist die biologische Verfügbarkeit von Antibiotika im Boden. Diese kann auf Grund von Sorption (Tolls 2001) oder Abbau (Ingerslev und Halling-Sørensen 2001) im Boden deutlich unter der eingesetzten Menge liegen. Hierbei könnten Versuche mit Bodeneluaten und Antibiotika-sensitiven Bakterien eine Vorstellung über die Bioverfügbarkeit liefern. In zukünftigen Untersuchungen sollten zusätzlich die Antibiotika-Konzentrationen im Boden über die gesamte Versuchsdauer mitgemessen werden.

Die hier angegebenen Daten gelten ausschließlich für das untersuchte Antibiotikum (Tetrazyklin) und die verwendeten Bodenarten. Andere Substanzen können ein vollkommen anderes Verhalten in der Umwelt aufweisen, was wiederum sehr stark von der Bodenbeschaffenheit beeinflusst wird.

Struktur bakterieller Bodengemeinschaften

Die T-RFLP Analyse bietet die Möglichkeit, kultivierungsunabhängig die Struktur der bakteriellen Lebensgemeinschaft vergleichend zu untersuchen. Mit dieser Technik konnte in den untersuchten Ansätzen kein eindeutiger Einfluss von Tetrazyklin auf die bakterielle Lebensgemeinschaft detektiert werden. Als Effekt wäre hier die Abnahme der Anzahl an Fragmenten pro T-RFLP-Muster zu werten. Wie in Abbildung 35 gezeigt, gab es im Vorversuch gewisse Hinweise, dass es über die Inkubation zu einer Verringerung kommt. Bei genauerer Betrachtung der Abbildung zeigt sich aber, dass diese Abnahme

auch bei der Kontrolle auftritt, somit der Effekt durch die Inkubation – unabhängig vom eingesetzten Antibiotikum – bedingt ist. Im Hauptversuch konnte dieser Effekt aber nicht mehr beobachtet werden. Es muss dazu gesagt werden, dass die ausschließliche Betrachtung der Gesamtzahl an Fragmenten pro T-RFLP-Muster eine wenig differenzierte Methode ist. Es fehlen zur Zeit aber die Informationen, in wie weit quantitative Änderungen innerhalb eines Musters einen Effekt darstellen. Um die Aussagekraft dieser Methode zu verbessern, sind noch einige methodische Weiterentwicklungen notwendig. Ein möglicher Ansatz wäre die Verwendung Gruppen-spezifischer Primer. Dadurch könnte die Änderung definierter Bakteriengruppen besser beurteilt werden. In diesem Zusammenhang wünschenswert wäre die Korrelation der einzelnen Fragmente zu definierten Bakteriengruppen. Eine Möglichkeit, um eine solche Korrelation zu erreichen, besteht in der parallelen Erstellung von 16S rDNA-Klonbibliotheken.

Bodenmikrobielle Aktivität

Generell kann gesagt werden, dass nur die höchste applizierte Tetrazyklinmenge von 1000 mg messbare Effekte auf die bodenmikrobielle Aktivität hatte. Es ist zu vermuten, dass die bioverfügbare Menge weit unter der Nominalkonzentration liegt. Weiterhin zeigte der adaptierte Boden „Dinklage“ im Vergleich zum Kontrollboden „Uesen“ immer eine verzögerte Reaktion auf die Antibiotikaapplikation.

Tetrazyklin hemmt die Proteinsynthese der Mikroorganismen. Das heißt, Effekte machen sich nur bei Organismen bemerkbar, die auf eine gesteigerte Proteinsynthese angewiesen sind. Dies ist bei der substratinduzierten Atmung (SIR) der Fall, wo sich die Mikroorganismen aufgrund der Nährstoffzugabe auf die Zellteilung vorbereiten. Vermutlich konnten aus diesem Grund in den Vorversuchen auch keine Effekte der Tetrazyklinapplikation auf die Basalatmung der Mikroorganismen erfasst werden. Bei der Basalatmung wird nur der Grundumsatz der zur Zeit aktiven Mikroorganismen erfasst.

Eine mögliche Erklärung für die verzögerte Reaktion im adaptierten Boden „Dinklage“ ist ein schlechterer physiologischer Zustand der mikrobiellen Population. Die regelmäßige Tetrazyklin Applikation über Gülledüngung könnte die Mikroorganismen soweit geschädigt haben, dass die bestehende Population generell inaktiver als im Boden „Uesen“ ist. Das würde auch die prozentual größere Hemmung der SIR im unadaptierten Boden „Uesen“ gegenüber dem adaptierten Boden „Dinklage“ nach Tetrazyklinapplikation erklären. Über die substratinduzierte Atmung werden alle aktivierbaren aeroben bzw. fakultativ aeroben Mikroorganismen erfasst. Bei geringer Aktivierung in der Kontrolle fällt auch die prozentuale Hemmung in den applizierten Ansätzen niedrig aus.

Die anhaltende Hemmung der SIR in beiden Böden lässt sich durch eine fehlende oder nicht ausreichende Ausbreitung resistenter Stämme erklären. Diese Aussage wird durch die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen unterstützt. Demnach führt die regelmäßige Applikation von Tetrazyklin im Boden zu keiner echten Adaptation der gesamten (aeroben) mikrobiellen Population durch Resistenzausbreitung.

Auch die kleine funktionelle Gruppe der Nitrifizierer, deren Aktivität durch die potenzielle Ammoniumoxidation erfasst wird, zeigt vergleichbare Abhängigkeiten. Wie bei der SIR setzt im vorbelasteten Boden „Dinklage“ die Hemmung verspätet ein, bleibt aber bis zum Versuchsende erhalten. Im Kontrollboden „Uesen“ ist sofort nach der Tetrazyklinapplikation eine starke Hemmung der Aktivität zu verzeichnen. Hier ist die Hemmung aber nach 28 d verschwunden. In diesem Fall könnte es sich um eine Adaptation der Mikroorganismen handeln, da sich schon wenige resistente Stämme bei der kleinen Gruppe der Nitrifizierer funktionell auswirken würden. Dies lässt sich aber nicht abschließend klären. Wie schon erwähnt, konnte in den molekularbiologischen Untersuchungen kein Anstieg von Resistenzen festgestellt werden. Dies ist aber nicht verwunderlich, da die Nitrifizierer nur einen kleinen Bestandteil der gesamten mikrobiellen Population im Boden bilden. Da selbst im unbelasteten Boden „Uesen“ gleiche Mengen resistenter

Stämme wie im belasteten Boden „Dinklage“ detektiert wurden, wird ein Anstieg von resistenten Stämmen in der Unterpopulation der Nitrifizierer prozentual nicht auffallen. Trotzdem ist es unserer Meinung nach nicht zwingend notwendig empfindlichere Testsysteme zu entwickeln, da schon in dieser Studie gezeigt werden konnte, dass sechs der untersuchten zehn Resistenzgene auch sporadisch in unbehandelten Kontrollen erfasst wurden. Dies bedeutet, die natürliche Varianz oder das sogenannte "Hintergrundrauschen" wird ausreichend erfasst.

Leider können die vorliegenden Ergebnisse nicht mit anderen Veröffentlichungen verglichen werden, da es sich um eine Pilotstudie handelt und auch zum Zeitpunkt der Berichtserstellung noch keine Ergebnisse weiterer Studien veröffentlicht waren (Höper et al. 2002).

7 **Schlussfolgerungen**

Teilvorhaben 1 und 2:

- Bei vergleichbarem Anfall an Wirtschaftsdüngernährstoffen und vergleichbarem Tetrazyklinaufwand sind bei gelagertem Masthähnchenfestmist im Gegensatz zu Schweinegülle geringere Tetrazyklin-Frachten in die Umwelt zu erwarten.
- Nach Aufbringung mit Gülle weist Tetrazyklin eine sehr geringe Verlagerungsneigung im Boden auf. Nur im anthropogen beeinflussten Lysimeter-System konnten vereinzelt Spuren von Tetrazyklin im Sickerwasser detektiert werden.
- Sulfadiazin ist deutlich weniger persistent in Gülle und Boden als Tetrazyklin. Trotzdem wurden für beide Wirkstoffe in Einzelfällen unter den gewählten experimentellen Bedingungen Überschreitungen der EMEA-Triggerwerte festgestellt.
- Die Untersuchungen bestätigen das bereits früher beschriebene Akkumulationspotenzial von Tetrazyklinen im Boden.

Teilvorhaben 3:

- Der TOC-Gehalt des Bodens beeinflusst deutlich die Wirkschwelle von Tetrazyklin bei der Bodenmikroflora.
- In umweltrelevanten Nominalkonzentrationen von Tetrazyklin im Boden erscheint eine Beeinträchtigung der Aktivität der Bodenmikroflora jedoch als unwahrscheinlich.
- Es ist nicht von Strukturveränderungen in der mikrobiellen Biozönose bei umweltrelevanten Nominalkonzentrationen von Tetrazyklin im Boden auszugehen.
- Messbare Auswirkungen auf die Existenz bzw. die Menge von Tetrazyklin-Resistenzgenen der Klassen A, B, D, E, M, O, Q, S, T und W sind bei umweltrelevanten Tetrazyklinkonzentrationen nicht zu erwarten.

8 **Ausblick**

In diesem Vorhaben wurden erste Erkenntnisse auf bislang noch wenig bearbeiteten Gebieten erzielt. Auf Basis dieser Ergebnisse ergeben sich neue Überlegungen und Ansatzpunkte, die in weiterführenden Versuchen untersucht werden müssten. Im folgenden Abschnitt sollen diese kurz dargestellt werden.

Das Ausscheidungsverhalten von Tetrazyklin durch Masthähnchen konnte aufgrund der Gruppenhaltung nur ansatzweise geprüft werden. Die Ergebnisse lassen keine Aussage über den tatsächlichen Anteil des ausgeschiedenen Wirkstoffs an der insgesamt aufgenommenen Menge zu. Auch konnte nicht ermittelt werden, in welcher Menge Tetrazyklin im Einzeltierorganismus aufgenommen und ausgeschieden wird. Gerade diese Aspekte sind jedoch von großer Bedeutung für eine realistische Risikoabschätzung, und die zu untersuchenden Parameter könnten in einer entsprechenden Versuchsanstellung (Einzeltierhaltung, ausreichende Wiederholungen, unterschiedliche Wirkstoffkonzentrationen) geprüft werden. In diesem Fall wäre auch denkbar, eine Untersuchung des Schlachtkörpers durchzuführen, um mögliche Tetrazyklinablagerungen in Knochen, Organen oder Gewebe zu identifizieren.

Durch den Pilotversuch zur Ermittlung der Persistenz von Tetrazyklin in Masthähnchenfestmist konnte zumindest ansatzweise eine Temperaturabhängigkeit beim Abbau des Antibiotikums gezeigt werden. Diesbezüglich wäre es bei weiteren Versuchen von großem Interesse, neben dem TC-Konzentrationsverlauf auch die Zusammensetzung der Mikroorganismen im Mist zu bestimmen. Möglicherweise verändert sich diese unter dem Einfluss von Tetrazyklin, was zu unterschiedlichen Abbauleistungen führen könnte. Ebenso sollte auf Basis der jetzt vorliegenden ersten Ergebnisse die Persistenz von Tetrazyklin während vollständiger Kompostierung oder anaerober Vergärung überprüft werden. Hier könnte auch die gezielte

Beeinflussung der Umsetzungsvorgänge durch verschiedene Zusätze wie Gesteinsmehl oder Biokompost untersucht werden.

Die Versuche des vorliegenden Vorhabens zur Mobilität von Tetrazyklin und Sulfadiazin in verschiedenen Böden haben lediglich Modellcharakter. Bei Gefäßversuchen besteht die Problematik, dass gestörte Böden eingesetzt werden, die von der Struktur her nicht direkt mit gewachsenen Böden vergleichbar sind. Auch seit mehreren Jahren befüllte Lysimeter stellen anthropogen beeinflusste Böden dar, so dass belastbarere Aussagen über die Mobilität bzw. die Immobilität von Tetrazyklinen und Sulfonamiden in verschiedenen Böden weitere Versuche unter Feldbedingungen erfordern. Der potenzielle Einfluss der Einarbeitungsform der Gülle auf die Verlagerungsneigung von Tetrazyklin sollte zusätzlich Berücksichtigung finden.

Hinsichtlich der Antibiotikaresistenz in Böden handelt es sich bei diesem Vorhaben um eine Pilot-Studie, die naturgemäß zahlreiche Fragen offen lässt oder sogar erst aufwirft. Um die in natürlichen Habitaten relevante Persistenz von Resistenzgenen besser einschätzen zu können wäre eine vertiefende Bearbeitung notwendig, die im Rahmen dieser Studie nicht möglich war.

Für sichere Aussagen müssten chemische Analysen durchgeführt werden, die die Gesamtgehalte und die bioverfügbaren Gehalte von Antibiotika erfassen. Unterstützend sollten Biotests zur Erfassung der Bioverfügbarkeit entwickelt und angewendet werden. Hierfür geeignet wäre beispielsweise ein Wachstumshemmtest mit Bakterien, in Gegenwart von Bodeneluaten aus Böden, denen Antibiotika appliziert wurden.

Bodenmikroorganismen besiedeln den Lebensraum Boden nicht alleine. Zahlreiche Studien befassen sich mit der Passage von Mikroorganismen durch den Darm von Vertretern der Meso- und Makrofauna. Es konnte gezeigt werden, dass die Abundanz bestimmter Mikroorganismen während der Darmpassage zunimmt (Zimmer 1998, Griffiths & Wood 1985). Untersuchungen von Thimm et al. (2001) und Daane et al. (1996) geben erste Hinweise darauf,

dass die Darmpassage von Mikroorganismen in Regenwürmern zu einer Anreicherung von resistenten Keimen führt. Weitergehende Studien zum Einfluss der Meso- und Makrofauna auf die Ausbildung und Anreicherung von Resistenzgenen in der mikrobiellen Population würden wichtige Aussagen hinsichtlich möglicher Effekte innerhalb der natürlichen Biozönose liefern.

In dieser Studie wurden die Untersuchungen auf Tetrazyklin beschränkt, da es aufgrund seiner starken Sorption im Boden akkumuliert. Dies ist aber auch ein möglicher Grund, warum Tetrazyklin selbst in nicht-umweltrelevanten Konzentrationen keinen messbaren Selektionsdruck auf die Mikroorganismen im Boden ausübt. Hinsichtlich der Erfassung von Ausbreitung und Persistenz von Resistenzgenen sollte der Einfluss weiterer Antibiotika untersucht werden. Dies gilt auch für gering sorbierende Wirkstoffe. Sie werden zwar schneller aus dem Boden ausgetragen, können aber aufgrund mehrmaliger Applikation (z.B. Gülledüngung) in für einen Selektionsdruck ausreichenden Mengen vorliegen.

Um die in natürlichen Habitaten relevante Persistenz von Resistenzgenen besser einschätzen zu können, wäre eine Ausweitung der quantitativen Erfassung wünschenswert. Größere Stichprobenumfänge und kürzere Zeitintervalle bei der Probennahme würden zu aussagekräftigeren Ergebnissen führen. Auch die Ausweitung des Methodenspektrums würde die gewonnenen Ergebnisse absichern. Hierzu bietet sich die PLFA-Analyse, eine Methode zur Erfassung von ausgesuchten Bestandteilen der mikrobiellen Zellmembran an. Diese Methode wird aufgrund ihrer Aussagekraft in den letzten Jahren immer häufiger zur Untersuchung der Struktur der mikrobiellen Biozönose angewendet (Calderón et al. 2001, Elsgaard et al. 2001, Ibekwe et al 2001).

9 Literaturverzeichnis

- ABBAS, B; LINKE, I; KRATZ, W (2001): Erhebung des Verbrauchs von Arzneimittelwirkstoffen im Land Brandenburg. *Zeitung für Umweltchemie und Ökotoxikologie* 13 (4):197-203.
- AMINOV, RI; GARRIGUES-JEANJEAN, N; MACKIE, RI (2001): Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 22-32.
- BERGER, K; PETERSEN, B; BÜNING-PFAUE, H (1986): Persistenz von Gülle-Arzneistoffen in der Nahrungskette. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 37:85-108.
- BfT (2002): Tierarzneimittelmarkt 2001 Deutschland. *Tiergesundheit im Blickpunkt* 39:3.
- BOXALL, ABA; BLACKWELL, P; CAVALLO, R; KAY, P; TOLLS, J (2002): The sorption and transport of sulphonamide antibiotic in soil systems. *Toxicology Letters* 131:19-28.
- CALDERON, FJ; JACKSON, L.E; SCOW, KM; ROLSTON, DE (2001): Short-term dynamics of nitrogen, microbial activity, and phospholipid fatty acids after tillage. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 65: 118-126.
- CHEE-SANFORD, JC; AMINOV, RI; KRAPAC, IJ; GARRIGUES-JEANJEAN, N; MACKIE, R.I. (2001): Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (4): 1494-1502.
- DAANE, LL; MOLINA, JAE; BERRY, EC; SADOWSKY, MJ (1996): Influence of earthworm activity on gene transfer from *Pseudomonas fluorescens* to indigenous soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (2): 512-521.
- DAVISON, J (1999): Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 42: 73-91.

DECHEMA-ARBEITSGRUPPE "VALIDIERUNG BIOLOGISCHER TESTMETHODEN FÜR BÖDEN", DOTT, W (2001): Biologische Testverfahren für Boden und Bodenmaterial. 7. Bericht des Interdisziplinären Arbeitskreises "Umweltbiotechnologie – Boden". Dechema, Frankfurt a.M., 61 pp.

DüngeVO (1996): BGBl I, 118.

ELSGAARD, L; PETERSEN, SO; DEBOSZ, K (2001): Effects and risk assessment of linear alkylbenzene sulfonates in agricultural soil. 1. Short-term effects on soil microbiology. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (8): 1656-1663.

EMA/CVMP (2000): Guideline on environmental impact assessment for veterinary products CVMP/VICH/592/98. London, United Kingdom.

EU-KOMMISSION (KOM) (2002): Vorschlag für eine Verordnung des Europäischen Parlaments und des Rates über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung. 153 endg.; *Ratsdok.* 7505/02, Drucksache 340/02.

FAIRBROTHER, A; GLAZEBROOK, PW; VAN STRAALLEN, N; TARAZONA, J (1999): Summary of the SETAC Workshop on Test Methods for Hazard Determination of Metals and Sparingly Soluble Metal Compounds in Soil; 19-23 June 1999; San Lorenzo de El Escorial, Spain. SETAC Press, Pensacola, 23 pp.

FEDESA (1999): Antibiotics for animals: A FEDESA perspective on antibiotics, animal health and the resistance debate. www.fedesa.be.

FEDESA (2001): Antibiotic use in farm animals does not threaten human health, a new study suggests. www.fedesa.be/Pressroom/PR-130601.htm.

GAVALCHIN, J; KATZ, SE (1994): The persistence of fecal-borne antibiotics in soil. *Journal of AOAC International* 77 (2):481-485.

GRAFE, A (2001): Untersuchungen zum Einsatz pharmakologisch wirksamer Stoffe in der Veredelungswirtschaft unter besonderer Berücksichtigung der Tetracykline. Göttingen: Cuvillier Verlag Göttingen. 1-157.

GRIFFITHS, BS; WOOD, S (1985): Microorganisms associated with the hindgut of *Oniscus asellus* (Crustacea, Isopoda). *Pedobiologia* 28: 377-381.

- GUILLAUME, G; VERBRUGGE, D; CHASSEUR-LIBOTTE, M-L; MOENS, W; COLLARD, J-M (2000): PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A-E) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. *FEMS Microbiology Ecology* 32: 77-85.
- HALLER, MY; MÜLLER, S; McARDELL, CS; ALDER, AC; SUTER, MJ-F (2002): Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 952 (1-2):111-120.
- HAMSCHER, G (2000): Tierarzneimittelrückstände: Tetrazyklin auf dem Acker. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 8: 323-325.
- HAMSCHER, G; SCZESNY, S; ABU-QUARE, A; HÖPER, H; NAU, H (2000): Stoffe mit pharmakologischer Wirkung einschließlich hormonell aktiver Substanzen in der Umwelt: Nachweis von Tetrazyklinen in güllegedüngten Böden. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 107 (8):293-348.
- 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.
- HARTIG, C; STORM, T; JEKEL, M (1999): Detection and identification of sulphonamide drugs in municipal waste water by liquid chromatography coupled with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 854:163-173.
- HIRSCH, R; TERNES, T; HABERER, K; MEHLICH, A; BALLWANZ, A; KRATZ, K-L (1998): Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 815:213-223.
- HOLTEN LÜTZHØFT, HC; VAES, WHJ; FREIDIG, AP; HALLING-SØRENSEN, B; HERMENS, JLM (2000): Influence of pH and other modifying factors on the distribution behaviour of 4-quinolones to solid phases and humic acids studied by 'negligible-depletion' SPME-HPLC. *Environmental Science & Technology* 34:4989-4994.
- HÖPER, H; KUES, J; NAU, H; HAMSCHER, G (2002): Eintrag und Verbleib von Tierarzneimittelwirkstoffen in Böden. *Bodenschutz* 4:141-148.

- IBEKWE, AM; PAPIERNIK, SK; GAN, J; YATES, SR; YANG, C-H; CROWLEY, DE (2001): Impact of fumigants on soil microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (7): 3245-3257.
- INGERSLEV, F; HALLING-SØRENSEN, B (2001): Biodegradability of metronidazole, olaquinox, and tylosin and formation of tylosin degradation products in aerobic soil-manure slurries. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 48: 311-320.
- ISO DIS 17155 (2001): Soil Quality – Determination of abundance and activity of the soil microflora using respiration curves.
- ISO DIS 15685 (2001): Soil quality - Determination of potential nitrification - Rapid test by ammonium oxidation.
- JAGNOW, G (1977): Mikrobieller Abbau der Futtermittelantibiotika Zink-Bacitracin, Flavophospholipol, Spiramycin und von Tetrazyklin in feucht gelagertem und in mit Boden vermischtem Hühnerkot. *Landwirtschaftliche Forschungsanstalt, Kongressband, Teil 1* (1):227-234.
- JENSEN, LB; BALODA, S; BOYE, M; AARESTRUP, FM (2001): Antimicrobial resistance among *Pseudomonas* spp. and the *Bacillus cereus* group isolated from Danish agricultural soil. *Environment International* 26 (7-8): 581-587.
- KROKER, R (1983): Aspekte zur Ausscheidung antimikrobiell wirksamer Substanzen nach der chemotherapeutischen Behandlung von Nutztieren. *Wissenschaft und Umwelt* 4:305-308.
- KROKER, R; LÖSCHER, W; ŠIMŮNEK, J; TROLLDENIER, H; UNGEMACH, FR (1996): Chemotherapie bakterieller Infektionen. In: Frey, H-H und Löscher, W (Hg.): *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Enke, Stuttgart.
- KROKER, R (1997): Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen. In: Löscher, W et al. (Hg.): *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. 3. Auflage, Parey, Berlin.
- KÜHNE, M; IHNEN, D; MÖLLER, G; AGTHE, O (2000). Stability of tetracycline in water and liquid manure. *Journal of Veterinary Medicine A* 47:379-384.
- KÜHNE, M; HAMSCHE, 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.

LANGHAMMER, J-P (1989): Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe als Rückstände in Gülle und im landwirtschaftlichen Umfeld. Dissertation Universität Bonn.1-138.

LINDSEY, ME; MEYER, M; THURMAN, EM (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 (19):4640-4646.

McGECHAN, MB; LEWIS, DR (2002): Transport of particulate and colloid-sorbed contaminants through soil, part 1: General principles. *Biosystems Engineering* 83 (3):255-273.

MONTFORTS, MHMM; KALF, DF; VLAARDINGEN VAN, PLA; LINDERS, JBHJ (1999): The exposure assessment for veterinary medicinal products. *The Science of the Total Environment* 225:119-133.

NWOSU, VC (2001): Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms Res. *Microbiol.* 152:421-430.

PFEIFER, T; TUEK, 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.

RABØLLE, M; SPLIID, NH (2000): Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. *Chemosphere* 40:715-722.

RASSOW, D; SCHAPER, H (1996): Zum Einsatz von Fütterungsarzneimitteln in Schweine- und Geflügelbeständen in der Region Weser-Ems. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 103 (7):244-249.

SALYERS, A; AMABILE-CUEVAS, CF (1997): Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrob. Agents Chemother* 41: 2321-2325.

SCHEFFER, F; SCHACHTSCHABEL, P (1992): Lehrbuch der Bodenkunde. 13. Auflage, Enke, Stuttgart.

SCHMITT-KOPPLIN, P; BURHENNE, J; FREITAG, D; SPITELLER, M; KETTRUP, A (1999): Development of capillary electrophoresis methods for the analysis of fluoroquinolones and application to the study of the influence of humic substances on their photodegradation in aqueous phase. *Journal of Chromatography A* 837:253-265.

- SITHOLE, BB; GUY, RD (1987): Models for oxytetracycline in aquatic environments. Interactions with humic substances. *Water, Air and Soil Pollution* 32: 315-321.
- STREBE, TA; TALBERT, RE (2001): Sorption and mobility of flumetsulam in several soils. *Weed Science* 49:806-813.
- THIMM, T; HOFFMANN, A; TEBBE, CC (2001): Contribution of the earthworm *Lumbricus rubellus* (Annelida, Oligochaeta) to the establishment of plasmids in Soil Bacterial Communities. *Microbial Ecology* 41: 341-351.
- TOLLS, J (2001): Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. *Environmental Science & Technology* 35, No 17:3397-3405.
- WINCKLER, C; GRAFE, A (2000): Charakterisierung und Verwertung von Abfällen aus der Massentierhaltung unter Berücksichtigung verschiedener Böden. UBA-Text 44/00. Umweltbundesamt. *Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit* Forschungsbericht 297 33 911:1-145.
- ZHU, J; SNOW, DD; CASSADA, DA; MONSON, SJ; SPALDING, RF (2001): Analysis of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 928:177-186.
- ZIMMER, M (1998): Wechselwirkungen zwischen Vertretern der saprophagen Bodenmakrofauna und saprotrophen Mikroorganismen. *Cuvillier Verlag*, Göttingen, 159 pp.

10 Anhang

Tabelle 31: Tetrazyklin-Konzentration im Hühnerkot (mg TC/kg Kot) der Varianten 1, 3, 4 und 6 bei 10-tägiger TC-Applikation (Tag 1 bis Tag 12), bezogen auf TS (%); die Kontrollvarianten V2 und V5 mit 0 g TC sind nicht aufgeführt

Zeit	V1: 0,5 g TC/kg Futter (mg/kg)	V3: 0,5 g TC/kg Futter (mg/kg)	V4: 1,0 g TC/kg Futter (mg/kg)	V6: 1,0 g TC/kg Futter (mg/kg)
Tag 2	k.P*	k.P	k.P	k.P
Tag 4	k.P	k.P	k.P	k.P
Tag 6	827,4	416,5	534,6	1347,1
Tag 8	690,7	836,7	1299,7	1684,3
Tag 10	2139,3	1143,5	2742,2	2788,9
Tag 12	1319,3	2476,2	1906,1	2984,7
Tag 13	190,0	162,9	379,0	414,2
Tag 14	n.n.**	n.n.	n.n.	16,3
Tag 15	168,5	10,0	82,9	196,4
Tag 16	7,7	22,4	38,3	72,5
Tag 17	1,5	n.n.	7,9	17,5
Tag 18	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Tag 19	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

* nicht genügend Probenmaterial für Analyse

** nicht nachweisbar, < 1 mg/kg Bestimmungsgrenze

Tabelle 32: Tetrazyklin-Konzentrationen im Masthähnchenfestmist (mg TC/kg Kot) der Varianten 1, 3, 4 und 6 während der 3-monatigen Kompostierung, bezogen auf TS (%) und C (%); die Kontrollvarianten V2 und V5 mit 0 g TC sind nicht aufgeführt

Zeit	V1: 0,5 g TC/kg Futter (mg/kg)	V3: 0,5 g TC/kg Futter (mg/kg)	V4: 1,0 g TC/kg Futter (mg/kg)	V6: 1,0 g TC/kg Futter (mg/kg)
Tag 1	24,7	41,8	52,9	95,0
Tag 11	7,3	11,1	28,3	24,8
Tag 29	16,0	15,7	70,6	29,6
Tag 43	6,0	3,6	31,1	31,0
Tag 58	11,9	2,6	45,3	19,9
Tag 72	11,3	2,4	10,7	15,7
Tag 86	3,8	0,0	28,3	20,9

Tabelle 33: Ermittelte Wirkstoffkonzentrationen (TC, OTC, CTC, SD, SM) des Screening der Schweinegülleproben aus dem Winter 2001/2002, n=176

lauf. Nr.	TS (%)	N (%)	TC (mg/kg)	OTC (mg/kg)	CTC (mg/kg)	SD (mg/kg)	SM (mg/kg)
1	k.A.	0,19	n.n.*	n.n.	n.n.	n.n.	8,6
2	k.A.	0,64	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	4,5
3	2,7	0,37	1,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
4	1,8	0,25	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
5	2,6	0,27	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
6	1,0	0,18	n.n.	n.n.	n.n.	1,4	n.n.
7	2,0	0,21	n.n.	n.n.	n.n.	3,9	n.n.
8	2,7	0,28	8,2	n.n.	n.n.	14,5	n.n.
9	2,0	0,22	0,9	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
10	1,2	0,21	n.n.	n.n.	n.n.	1,7	n.n.
11	2,0	0,46	n.n.	n.n.	n.n.	2,3	7,9
12	2,4	0,37	n.n.	n.n.	n.n.	3,0	n.n.
13	1,3	0,36	n.n.	n.n.	n.n.	2,2	n.n.
14	2,7	0,53	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
15	2,8	0,29	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
16	2,6	0,46	n.n.	n.n.	n.n.	2,4	n.n.
17	2,6	0,25	n.n.	n.n.	n.n.	2,8	n.n.
18	1,0	0,23	n.n.	n.n.	n.n.	2,1	n.n.
19	1,9	0,41	2,1	n.n.	n.n.	3,2	2,9
20	2,4	0,35	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
21	2,7	0,31	n.n.	n.n.	1,6	n.n.	n.n.
22	2,3	0,27	n.n.	n.n.	n.n.	2,1	11,9
23	1,5	0,35	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
24	1,7	0,21	n.n.	n.n.	n.n.	2,8	n.n.
25	0,9	0,23	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
26	2,1	0,24	n.n.	n.n.	n.n.	1,9	1,7
27	2,8	0,42	3,7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
28	2,3	0,31	5,4	n.n.	n.n.	n.n.	5,8
29	2,4	0,26	3,4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
30	2,1	0,24	n.n.	n.n.	n.n.	1,6	2,2
31	1,7	0,33	3,8	n.n.	n.n.	6,2	3,2
32	2,3	0,35	n.n.	n.n.	n.n.	1,3	7,1
33	2,5	0,29	n.n.	n.n.	n.n.	3,0	n.n.
34	2,5	0,40	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,9
35	2,6	0,23	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,8
36	2,8	0,54	3,7	n.n.	n.n.	n.n.	16,3
37	2,8	0,38	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
38	1,0	0,17	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
39	0,8	0,29	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,0
40	0,9	0,15	n.n.	n.n.	n.n.	2,1	n.n.

Tabelle 33: Fortsetzung

lauf. Nr.	TS (%)	N (%)	TC (mg/kg)	OTC (mg/kg)	CTC (mg/kg)	SD (mg/kg)	SM (mg/kg)
41	2,5	0,29	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,3
42	0,7	0,18	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,4
43	2,0	0,32	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
44	1,7	0,29	n.n.	n.n.	2,0	n.n.	2,4
45	2,2	0,28	1,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
46	2,8	0,32	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
47	1,3	0,21	n.n.	n.n.	n.n.	3,6	n.n.
48	2,4	0,32	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
49	1,7	0,22	7,7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
50	2,3	0,31	3,8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
51	2,7	0,35	n.n.	n.n.	1,1	n.n.	n.n.
52	1,3	0,17	3,4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
53	5,7	0,63	n.n.	n.n.	n.n.	5,9	n.n.
54	3,6	0,33	n.n.	n.n.	n.n.	2,8	n.n.
55	4,7	0,31	n.n.	n.n.	n.n.	3,1	n.n.
56	3,7	0,35	n.n.	n.n.	n.n.	2,8	n.n.
57	3,8	0,33	n.n.	n.n.	n.n.	0,7	n.n.
58	3,9	0,51	n.n.	3,8	n.n.	n.n.	n.n.
59	3,0	0,19	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
60	4,7	0,52	3,1	n.n.	n.n.	5,8	5,7
61	3,4	0,48	7,7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
62	4,2	0,88	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
63	3,5	0,39	2,3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
64	3,7	0,38	2,4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
65	4,9	0,42	4,5	n.n.	n.n.	n.n.	3,1
66	3,5	0,40	20,5	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
67	5,3	0,39	n.n.	n.n.	n.n.	3,0	2,0
68	5,4	0,47	n.n.	n.n.	n.n.	2,8	n.n.
69	5,3	0,47	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
70	3,9	0,51	11,9	n.n.	n.n.	3,5	14,6
71	5,2	0,34	n.n.	n.n.	n.n.	2,6	n.n.
72	6,3	0,54	6,4	n.n.	n.n.	n.n.	2,2
73	4,0	0,64	1,1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
74	4,1	0,47	n.n.	n.n.	n.n.	1,6	n.n.
75	5,4	0,50	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
76	5,5	0,48	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
77	4,3	0,60	15,3	n.n.	n.n.	1,9	11,1
78	3,8	0,58	21,4	n.n.	n.n.	2,5	n.n.
79	5,3	0,42	6,8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
80	4,0	0,43	8,9	n.n.	n.n.	2,6	2,1
81	4,9	0,50	14,9	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
82	5,0	0,49	4,3	n.n.	4,7	3,1	n.n.
83	5,7	0,75	n.n.	n.n.	n.n.	8,6	6,6

Tabelle 33: Fortsetzung

lauf. Nr.	TS (%)	N (%)	TC (mg/kg)	OTC (mg/kg)	CTC (mg/kg)	SD (mg/kg)	SM (mg/kg)
84	3,6	0,31	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	29,9
85	3,7	0,43	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,4
86	3,3	0,49	n.n.	n.n.	n.n.	2,2	2,5
87	4,5	0,64	n.n.	n.n.	n.n.	2,8	5,6
88	3,1	0,39	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
89	5,0	0,77	3,1	n.n.	n.n.	4,2	4,4
90	3,9	0,53	6,2	n.n.	n.n.	n.n.	7,0
91	4,5	0,56	10,9	n.n.	n.n.	4,0	2,1
92	5,3	0,54	6,3	n.n.	n.n.	3,2	7,1
93	3,8	0,46	6,9	n.n.	n.n.	2,6	3,9
94	5,1	0,57	5,2	n.n.	n.n.	n.n.	3,6
95	4,1	0,60	3,3	n.n.	n.n.	n.n.	7,3
96	5,8	0,42	12,0	n.n.	n.n.	n.n.	2,6
97	4,3	0,43	3,8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
98	5,2	0,54	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,5
99	4,0	0,62	5,4	n.n.	n.n.	2,4	1,6
100	3,8	0,39	n.n.	25,3	n.n.	n.n.	n.n.
101	3,3	0,32	n.n.	n.n.	3,6	n.n.	n.n.
102	5,2	0,50	15,9	n.n.	n.n.	21,6	2,2
103	3,3	0,35	6,0	n.n.	n.n.	8,9	n.n.
104	3,2	0,39	20,9	n.n.	5,3	n.n.	5,6
105	3,0	0,23	n.n.	n.n.	n.n.	2,1	2,0
106	5,9	0,58	18,6	n.n.	6,4	21,3	4,4
107	3,7	0,33	6,8	n.n.	n.n.	1,6	n.n.
108	3,7	0,39	n.n.	n.n.	n.n.	9,7	1,8
109	4,6	0,33	n.n.	n.n.	2,3	n.n.	n.n.
110	5,5	0,76	n.n.	n.n.	n.n.	3,5	2,9
111	4,7	0,59	35,5	n.n.	n.n.	n.n.	10,0
112	3,2	0,31	3,9	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
113	4,8	0,52	13,7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
114	4,2	0,52	13,9	n.n.	n.n.	n.n.	11,9
115	4,2	0,46	n.n.	n.n.	n.n.	7,2	2,7
116	4,1	0,42	6,5	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
117	3,2	0,69	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	2,0
118	4,3	0,42	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
119	4,0	0,54	2,5	n.n.	5,4	n.n.	4,8
120	5,9	0,59	2,0	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
121	7,1	0,46	n.n.	n.n.	n.n.	1,9	n.n.
122	6,9	0,68	20,1	n.n.	n.n.	4,9	2,8
123	7,1	0,59	n.n.	n.n.	n.n.	1,6	n.n.
124	7,8	0,45	n.n.	n.n.	n.n.	5,4	3,8
125	8,4	0,76	38,4	n.n.	n.n.	8,4	n.n.
126	7,4	0,57	16,9	n.n.	n.n.	35,3	12,2

Tabelle 33: Fortsetzung

lauf. Nr.	TS (%)	N (%)	TC (mg/kg)	OTC (mg/kg)	CTC (mg/kg)	SD (mg/kg)	SM (mg/kg)
127	6,8	0,59	12,7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
128	6,6	0,45	12,4	n.n.	25,7	17,7	n.n.
129	7,1	0,59	n.n.	n.n.	n.n.	6,7	3,2
130	8,0	0,59	13,2	n.n.	6,9	2,7	3,8
131	6,5	0,55	24,6	n.n.	n.n.	1,9	4,6
132	6,4	0,69	n.n.	n.n.	n.n.	11,3	4,1
133	8,4	0,59	n.n.	n.n.	n.n.	6,1	2,7
134	7,6	0,69	3,7	n.n.	n.n.	3,0	2,1
135	6,0	0,53	5,7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
136	8,3	0,33	n.n.	n.n.	n.n.	1,5	3,5
137	6,3	0,69	3,7	n.n.	n.n.	2,2	n.n.
138	6,2	0,34	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	4,7
139	6,9	0,59	5,7	n.n.	4,2	n.n.	n.n.
140	6,6	0,60	1,7	1,6	n.n.	n.n.	1,0
141	7,5	0,53	6,1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
142	8,4	0,63	43,1	n.n.	5,2	2,8	4,9
143	7,9	0,61	10,9	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
144	6,7	0,48	15,7	n.n.	n.n.	n.n.	6,3
145	6,0	0,51	3,4	2,6	n.n.	11,4	4,7
146	7,9	0,73	8,8	n.n.	6,4	3,0	2,2
147	7,4	0,72	8,5	n.n.	n.n.	3,8	3,3
148	6,3	0,44	12,6	n.n.	n.n.	n.n.	7,8
149	6,7	0,58	7,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
150	6,9	0,47	5,2	n.n.	n.n.	1,9	n.n.
151	8,3	0,67	n.n.	n.n.	5,2	2,5	4,5
152	7,6	0,86	6,3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
153	6,6	0,35	13,6	n.n.	n.n.	n.n.	4,9
154	6,4	0,53	3,7	n.n.	n.n.	1,2	3,6
155	6,5	0,70	2,4	136,2	n.n.	n.n.	167,0
156	6,6	0,80	n.n.	n.n.	n.n.	2,4	3,7
157	10,7	0,75	n.n.	n.n.	n.n.	3,2	n.n.
158	9,1	1,01	11,2	n.n.	n.n.	5,4	n.n.
159	10,9	0,63	21,6	n.n.	n.n.	3,4	3,0
160	12,4	0,90	30,9	5,0	14,3	5,3	3,0
161	12,5	0,99	7,6	9,0	9,7	5,6	0,7
162	10,1	0,78	5,2	n.n.	n.n.	5,3	16,9
163	9,4	0,80	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	5,2
164	9,3	0,83	11,4	n.n.	n.n.	4,8	3,6
165	11,5	0,58	n.n.	n.n.	n.n.	2,5	n.n.
166	11,0	0,58	35,3	n.n.	n.n.	n.n.	3,7
167	10,0	0,82	7,3	n.n.	n.n.	7,0	n.n.
168	12,8	0,72	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
169	14,6	1,01	n.n.	8,0	n.n.	17,0	2,4

Tabelle 33: Fortsetzung

lauf. Nr.	TS (%)	N (%)	TC (mg/kg)	OTC (mg/kg)	CTC (mg/kg)	SD (mg/kg)	SM (mg/kg)
170	9,5	0,61	n.n.	1,8	2,0	n.n.	9,2
171	10,1	0,79	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	5,6
172	16,8	0,56	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
173	9,1	0,71	8,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
174	10,1	1,05	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
175	9,7	0,74	8,0	n.n.	n.n.	2,7	2,1
176	9,0	0,70	4,4	n.n.	n.n.	3,7	4,2

*n.n. nicht nachweisbar, < 0,8 mg/kg Tetrazyklin- bzw. < 0,7 mg/kg Sulfonamid- Bestimmungsgrenze

Tabelle 34: Tetrazyklin-Gehalte im Boden der Kick-Brauckmann-Gefäße, 48 h bzw. 10 Wochen nach Starkregenereignis

Probe	0- 12 cm Tiefe ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	12-24 cm Tiefe ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Kontrollen		
hS, Gefäß 5	-	-
IU, Gefäß 9	-	-
T, Gefäß 5	-	-
Starkregenereignis nach 48 h		
hS, Gefäß 2	2190,5	1338,4
hS, Gefäß 3	4745,4	238,4
hS, Gefäß 4	1757,2	286,4
IU, Gefäß 2	213,6	45,6
IU, Gefäß 3	8375,4	2676,9
IU, Gefäß 4	9171,7	332,4
T, Gefäß 2	319,8	209,6
T, Gefäß 3	203,1	193,4
T, Gefäß 4	339,1	77,5
Starkregenereignis nach 10 Wochen		
hS, Gefäß 10	723,8	< 1
hS, Gefäß 11	419,4	26,2
hS, Gefäß 12	515,0	49,9
IU, Gefäß 10	17,0	7,9
IU, Gefäß 11	27,7	2,9
IU, Gefäß 12	339,7	209,6
T, Gefäß 10	207,8	54,8
T, Gefäß 11	217,0	80,9
T, Gefäß 12	95,7	< 1

hS lehmiger Sand
IU lehmiger Schluff
T Nullerde/ Torf

Tabelle 35: Sulfadiazin-Gehalte im Boden der Kick-Brauckmann-Gefäße, 48 h bzw. 10 Wochen nach Starkregenereignis

Probe	0- 12 cm Tiefe ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Kontrollen	
hS, Gefäß 5	< 1
IU, Gefäß 9	< 1
T, Gefäß 5	< 1
Probennahme nach Beregnung 48 h nach Gülleausbringung	
hS, Gefäß 6	141,6
hS, Gefäß 7	153,3
hS, Gefäß 8	331,4
IU, Gefäß 6	77,5
IU, Gefäß 7	60,1
IU, Gefäß 8	61,2
T, Gefäß 6	17,6
T, Gefäß 7	40,7
T, Gefäß 8	26,2
Probennahme nach Beregnung 10 Wochen nach Gülleausbringung	
hS, Gefäß 14	44,3
hS, Gefäß 15	19,8
hS, Gefäß 16	32,4
IU, Gefäß 14	13,1
IU, Gefäß 15	4,5
IU, Gefäß 16	20,9
T, Gefäß 14	32,9
T, Gefäß 15	15,6
T, Gefäß 16	16,3

hS lehmiger Sand
 IU lehmiger Schluff
 T Nullerde/ Torf

Tabelle 36: Verlauf der Tetrazyklin-Gehalte im Boden ausgewählter Lysimeter während der Versuchsdauer (TC-Gabe über Gülle im Mai 2001 (Roggen früher, Mais später) und Mai 2002; Lys. 4+28 = 45,0 bzw. 44,3 mg TC; Lys. 13, 15, 33, 35 = 67,2 bzw. 66,5 mg TC)

Probe	Mai 2001 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Okt. 2001 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	März 2002 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Mai 2002 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Okt. 2002 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Lys 1 (K)	< 1	2,1	11,8	< 1	< 1
Lys 4	< 1*	20,5	22,5	54,0	67,6
Lys 13	< 1*	10,6	< 1	122,5	46,2
Lys 15	67,1**	25,4	17,4	63,9	85,5
Lys 25 (K)	< 1	1,8	14,1	< 1	< 1
Lys 28	< 1*	5,1	16,5	71,6	31,3
Lys 33	59,4**	28,1	18,8	96,0	73,0
Lys 35	< 1*	12,8	12,4	60,4	72,7

* Gülle- bzw. TC-Gabe noch nicht erfolgt (Mais)

** Gülle- bzw. TC-Gabe erfolgt (Roggen)

K Kontrolle

Tabelle 37: Verlauf der Sulfadiazin-Gehalte im Boden ausgewählter Lysimeter während der Versuchsdauer (SD-Gabe über Gülle im Mai 2002, Lys. 4+28 = 44,3 mg SD; Lys. 13, 15, 33, 35 = 66,5 mg SD)

Probe	Mai 2001 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Mai 2002 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Oktober 2002 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Lys 1 (K)	< 1	< 1	< 1
Lys 4	< 1	7,8	2,9
Lys 13	< 1	15,5	1,7
Lys 15	< 1	10,9	2,1
Lys 25 (K)	< 1	< 1	< 1
Lys 28	< 1	9,6	1,5
Lys 33	< 1	8,6	4,0
Lys 35	< 1	9,1	3,0

K Kontrolle

Tabelle 38: Verlauf der Chlortetrazyklin-Gehalte im Boden ausgewählter Lysimeter während der Versuchsdauer (Nebenbefund)

Probe	Mai 2001 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Okt. 2001 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	März 2002 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Mai 2002 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Okt. 2002 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Lys 1 (K)	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
Lys 4	2,6*	6,4	4,6	12,4	22,5
Lys 13	12,6*	5,0	< 2	25,9	18,4
Lys 15	7,2**	4,3	3,7	9,6	22,6
Lys 25 (K)	< 2	< 2	3,9	< 2	< 2
Lys 28	10,0*	5,7	6,4	15,3	17,7
Lys 33	10,6**	4,9	4,6	21,8	21,3
Lys 35	8,6*	4,0	4,0	8,0	24,8

* Gülle- bzw. TC-Gabe noch nicht erfolgt (Mais)

** Gülle- bzw. TC-Gabe erfolgt (Roggen)

K Kontrolle