

Abschlussbericht

Überführung neuartiger agrobiotechnologischer Verfahrensansätze zum sicheren Abbau antibiotischer Wirkstoffe in Wirtschaftsdünger und Weiterentwicklung einer begleitenden praxisrelevanten innovativen Messmethodik für Metaboliten und Transformationsprodukte

Kooperation *Abiotec II*

2019 LFE 0001

Koordinator:

Materialforschungs- und -prüfanstalt Weimar
Dr. E.- Peter Kulle
Coudraystraße 9
99423 Weimar



Partner:

Institut für Biogas, Kreislaufwirtschaft und Energie
Prof. Dr.- Ing. Frank Scholwin
Steubenstraße 15
99423 Weimar



Institut für Umweltmedizin, Labor
Dipl.- Biol. Rainer Stumm
Heinrich-Heine-Straße 3
99096 Erfurt



AGD Agrargenossenschaft Diedorf/ Eichsfeld e.G.
Gerd Degenhardt, Rüdiger Meyer
Katharinenberger Straße 4
99988 Diedorf



MPG Milchproduktion Am Stadtberg
GmbH & Co. Biogas KG (assoziiert)
Markus Reiter
Fumbach 143
37308 Bodenrode-Westhausen

Dr. E.- Peter Kulle
Projektleiter Kooperation *Abiotec II*
Weimar, 10.10.2023



Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	7
2	Zielstellung	12
3	Material und Methoden	14
3.1	Aktualisierung der Antibiotika- Recherche	14
3.2	Auswahl der antibiotischen Substanzen	14
3.3	Weiterentwicklung der LC-MS – Messmethodik	14
3.3.1	Theoretische Vorbetrachtung und Recherche	14
3.3.2	Analytik antibiotischer Veterinärpharmaka und Probenmatrices	15
3.3.3	Probenvorbereitung und Extraktion	17
3.3.4	Flüssigchromatographische Probentrennverfahren mittels hydrophiler Interaktionschromatographie (HILIC-HPLC)	17
3.3.5	Massenspektrometrische Detektion der Analyten	19
3.3.6	Auswahl eines geeigneten Sorbens für die Probenextraktion Bestimmung der Wiederfindungsraten bei gespikten Proben	20
3.4	Verfahrenstechnik - Verfahrensentwicklung und Abbauprobversuche	21
3.4.1	Ansatz und Durchführung von kleintechnischen und Feldversuchen	21
3.4.2	Parzellenversuche	21
3.4.3	Kompostierungs- und Vererdungsversuche	24
3.4.4	Entwässerungsversuche	24
3.5	Molekular- und Mikrobiologische Methoden	25
3.5.1	Molekularbiologie mittels Realtime-PCR	25
3.5.2	Definition von Targets für die qPCR	25
3.5.3	Extraktion von mikrobieller DNA aus Bodenproben	26
3.5.4	Mikrobiologische Untersuchungen	27
3.6	Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen	27
3.7	Internationaler Workshop	27
4	Ergebnisse und Diskussion	28
4.1	Aktualisierte Antibiotika- Recherche	28
4.2	Auswahl der antibiotischen Substanzen	30
4.3	Weiterentwicklung der LC-MS – Messmethodik	31

4.4	Verfahrenstechnik - Verfahrensentwicklung und Abbaupersuche	31
4.4.1	Parzellenversuche	31
4.4.2	Kompostierungs- und Vererdungsversuche	36
4.4.3	Entwässerungsversuche	39
4.5	Molekular- und Mikrobiologische Arbeiten und Untersuchungen	40
4.5.1	Ansatz und Durchführung der qPCR	40
4.5.2	Mikrobiologische Untersuchungen	42
4.6	Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen	50
4.7	Internationaler Workshop	54
5	Schlussfolgerungen und Ausblick	58
6	Zusammenfassung	62
7	Literaturverzeichnis	63

Danksagung

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

a	Jahr
Abb.	Abbildung
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
ct	Cent
dot	dotiert
dt	Dezitonne
ELER	Europäischer Landwirtschaftsfonds für die Entwicklung des ländlichen Raums
EMA	European Medicines Agency
et al.	et alii (deutsch: und andere)
EU	Europäische Union
€	Euro
FKZ	Förderkennzeichen
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
ggf.	gegebenenfalls
GKZ	Gesamtkeimzahl
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
h	Stunde
ha	Hektar
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitchromatographie)
HR-LCMS	High resolution liquid chromatography mass spectrometry
HTK	Hühnertrockenkot
IBKE	Institut für Biogas, Kreislaufwirtschaft und Energie
inkl.	inklusive
IUML	Institut für Umweltmedizin, Labor
kg	Kilogramm
l	Liter
LC	Liquid chromatography (Flüssigkeitchromatographie)
LFE	Förderung der Zusammenarbeit in der Land-, Forst- und Ernährungswirtschaft
m	Meter
m ²	Quadratmeter
m ³	Kubikmeter
MFPA	Materialforschungs- und -prüfanstalt
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
Mig	Migration
min	Minute
ml	Milliliter
n	Anzahl
NLWKN	Niedersächsischer Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz

%	<i>Prozent</i>
RiMi	<i>Rindermist</i>
RiGR	<i>Rindergärrest</i>
RiGü	<i>Rindergülle</i>
rpm	<i>Umdrehungen pro Minute</i>
SG	<i>Schweinegülle</i>
S / Str	<i>Stroh</i>
SPE	<i>solid phase extraction</i>
TAB	<i>Thüringer Aufbaubank</i>
Tab.	<i>Tabelle</i>
TLL	<i>Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft</i>
TLLLR	<i>Thüringer Landesamt für Landwirtschaft und Ländlichen Raum</i>
TLV	<i>Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz</i>
TM	<i>Trockenmasse</i>
TMIL	<i>Thüringer Ministerium für Infrastruktur und Landwirtschaft</i>
u.a.	<i>unter anderem</i>
UBA	<i>Umweltbundesamt</i>
undot	<i>undotiert</i>
UV	<i>Ultraviolett</i>
VDLUFA	<i>Verband deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten</i>
vgl.	<i>vergleiche</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
z.B.	<i>zum Beispiel</i>

1 Einleitung

Der Einsatz von Antibiotika ist eine Voraussetzung für eine hochproduktive Tierhaltung. Weltweit ist Schätzungen zufolge bis 2030 mit einem Anstieg auf mehr als 100.000 t beim Antibiotika-Einsatz zu rechnen (*de Jong et al., 2014; van Boeckel et al., 2015*). Dabei wird in China der Hauptanteil eingesetzt werden. In der Bundesrepublik Deutschland ermittelt und veröffentlicht das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) seit 2011 Daten über die von Tierärzten abgegebenen Antibiotikaabgabemengen.

Die *Abbildung 1* veranschaulicht die abgegebenen Mengen von Veterinärantibiotika in Deutschland aufgeteilt in Regionen im Vergleich der Jahre 2011 und 2021 (*BVL, 2022*).

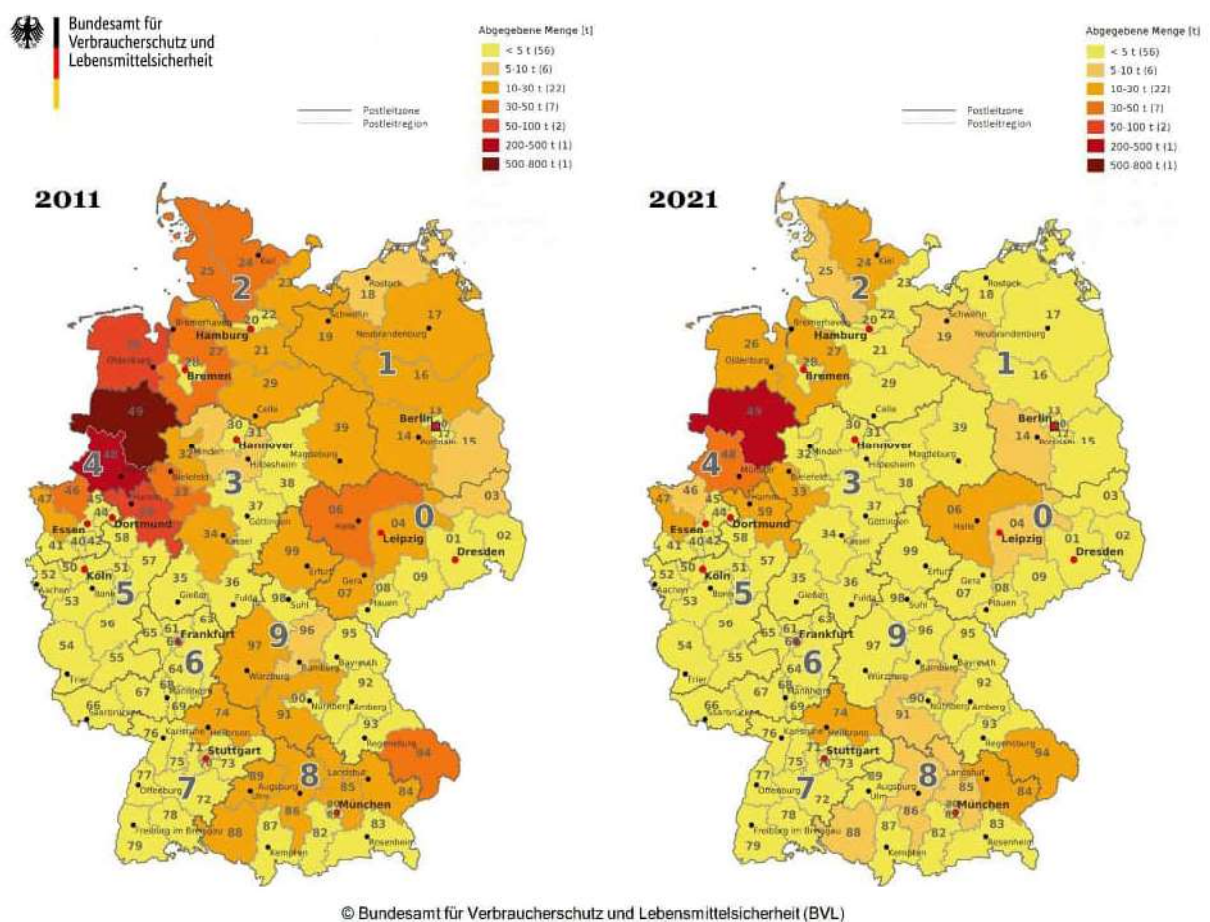


Abbildung 1: Antibiotika-Abgabemengen in der Tiermedizin nach Postleitzonen in den Jahren 2011 und 2021

Auffallend ist der starke Rückgang bei den Abgabemengen von Veterinärantibiotika in nahezu allen Teilen Deutschlands, was auch mit einem Rückgang der Zahlen der gehaltenen Tiere zu tun hat. Die dargestellte Zonierung hinsichtlich der Abgabemengen weist auf die Schwerpunktregionen wie z.B. in Nordwestdeutschland hin, wo hohe Tierbesatzdichten bezogen auf die verfügbare landwirtschaftliche Nutzfläche zu verzeichnen sind. Aber auch Regionen in Ostdeutschland und im Süden Deutschlands sind auffällig.

Die Abgabemenge für Veterinärantibiotika 2021 lag insgesamt bei 601 t, wobei in den Jahresvergleichen zu 2011 bei einzelnen Wirkstoffgruppen (*Tetracycline*, *Penicilline*, *Makrolide*, *Sulfonamide*, *Polypeptidantibiotika*) erhebliche Reduzierungen, bei anderen geringfügige Abnahmen oder Stagnation, zumindest in den zurückliegenden fünf Jahren, zu verzeichnen waren (*Cephalosporine*, *Fenicole*, *Lincosamide*) wie die *Tabelle 1* zeigt.

Einzelne Studien haben gezeigt, dass Antibiotika aus der Tierhaltung mittlerweile im Grundwasser nachweisbar sind (*Umweltbundesamt*, Texte 27/2014; *NLWKN*, 2016; *Ternes et al.*, 2017). Besonders Antibiotika aus den Stoffgruppen der *Tetracycline*, *Sulfonamide* und β -*Lactame* konnten in Regionen mit hoher Viehdichte nachgewiesen werden.



Tab. 1: Vergleich der Antibiotika-Abgabemengen bezogen auf die Wirkstoffklassen 2011 bis 2021

Wirkstoffklasse	Abgabemenge [t]											Differenz [t] 2011-2021
	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	
Aminoglykoside	47	40	39	38	25	26	29	30	34	36	30	-17
Cephalosp., 1. Gen.	2,0	2,1	2,1	2,1	1,9	2,0	2,0	2,1	2,1	2,0	2,2	0,2
Cephalosp., 3. Gen.	2,1	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	1,3	1,0	1,0	0,9	-1,2
Cephalosp., 4. Gen.	1,4	1,4	1,4	1,4	1,3	1,1	1,1	0,5	0,3	0,3	0,3	-1,1
Fenicole	6,1	5,7	5,2	5,3	5,0	5,1	5,6	6,0	6,3	6,3	5,8	-0,3
Fluorchinolone	8,2	10,4	12,1	12,3	10,6	9,3	9,9	7,7	6,0	6,4	5,6	-2,6
Folsäureantagonisten	30	26	24	19	10	9,8	7,8	8,0	8,1	8,9	9,1	-20,9
Fusidinsäure*												
Ionophore*												
Lincosamide	17	15	17	15	11	9,9	11	9,9	13	13	13	-4
Makrolide	173	145	126	109	52	55	55	59	57	61	46	-127
Nitrofurane*												
Nitroimidazole*												
Penicilline	528	501	473	450	299	279	269	271	264	278	235	-293
Pleuromutiline	14	18	15	13	11	9,9	13	8,2	7,7	10,5	8,0	-6
Polypeptidantibiotika	127	123	125	107	82	69	74	74	66	60	51	-76
Sulfonamide	185	162	152	121	73	69	62	63	59	65	64	-121
Tetrazykline	564	566	454	342	221	193	188	178	140	148	125	-439
Summe	1.706	1.619	1.452	1.238	805	742	733	722	670	701	601	-1.105

Scheinbare Ungenauigkeiten oder Abweichungen bei den Mengenangaben sind durch Rundungseffekte bedingt.

*Wahrung des Geschäfts- und Betriebsgeheimnisses, Daten dürfen nicht veröffentlicht werden, da es i. d. R. nur einen Zulassungsinhaber gibt (nach § 6 IFG und § 9 Abs. 1 (3) UIG)

Die hohe gesundheitliche Relevanz, u.a. das Auftreten bakterieller Multiresistenzen (*Nicoloff und Andersson*, 2016; *Christou et al.*, 2017a; *Gaze und Depledge*, 2017; *Westphal-Settele et al.*, 2018) und die umweltpolitische Brisanz der unkontrollierten Verbreitung von Antibiotikarückständen (*Halling-Soerensen et al.*, 1998; *Kümmerer et al.*, 2000; *Deutscher Bundestag*, 2018) sowie die Tatsache, dass es bisher keine genormte Analytik für Antibiotika in den verschiedenen, sehr komplexen Matrices gibt, machen es notwendig, Möglichkeiten für die sichere qualitative und quantitative Bestimmung von Antibiotika in Gärresten, Gülle, Jauche und Festmist zu erarbeiten und weiter zu entwickeln.

Die schwierige Probenmatrix der Wirtschaftsdünger erschwert eine analytische Bestimmung außerordentlich. In Europa, wahrscheinlich sogar weltweit, sind methodische Verfahren bisher nicht ausreichend entwickelt und verfügbar (*Farre' et al., 2008; Wang et al., 2013; Tolzin-Banasch et al., 2015*).

Neuere Untersuchungen der Universität Gießen zeigen, dass viele in der Tiermedizin verwendete Antibiotika in Biogasanlagen nicht abgebaut werden. Die für die Eliminierung von Antibiotika in verschiedenen Güllebehandlungsverfahren relevanten Prozesse blieben bisher zumeist unbekannt bzw. wurden nur in sehr wenigen Studien untersucht (*Spielmeyer et al., 2018*). Antibiotikarückstände unterliegen in den verschiedenen Umweltkompartimenten sehr vielfältigen (teils reversiblen) Adsorptions-, Transport- und Metabolisierungsprozessen (*Hamscher und Mohring, 2012; Parshikov und Sutherland, 2012; Tolzin-Banasch et al., 2015; Boxall, 2019; Thiele-Bruhn, 2019*), wie während des internationalen Workshops im Rahmen des ABIOTEC-Projektes am 10./11.01.2019 dargelegt wurde. Derartige Prozesse sind wissenschaftlich kaum oder nur in ersten Ansätzen geklärt (vgl. *Abb.2*).

Die Entwicklung und Validierung von Methoden, respektive auch Einzelmethoden, zur Bestimmung von Antibiotikarückständen in verschiedenen, z.T. komplexen Matrices ist sehr anspruchsvoll und zeit- und personalintensiv (*Bottoni et al., 2010; Ratsak et al., 2013; Jakimska et al., 2014; Tolzin-Banasch et al., 2015; Zühlke, 2019*). Europa- und weltweit gibt es bisher keine bekannten gesicherten und normierten Messmethoden für Antibiotika sowie deren Metabolite und Transformationsprodukte in den genannten Matrices. Bei der Erarbeitung und Validierung einer bundesweit einheitlichen Standardmethode für die Analyse von Veterinärantibiotika in Futtermitteln im Rahmen des VDLUFA ist die TLLR als beratender Partner federführend beteiligt. Insbesondere der bilanzierte Abbau der Substanzen in den verschiedenen Matrices wurde noch nicht detailliert untersucht. Das angestrebte Projekt versteht sich als praxisrelevante Vertiefung und Fortführung der „*Thüringer Antibiotikastudie*“, die u.a. die Methodenentwicklung für die messtechnische Erfassung von Antibiotika zum Inhalt hatte (*Tolzin-Banasch et al., 2015*).

Eine Reihe von Forschungsarbeiten zeigten bereits den Abbau verschiedener anthropogener Spurenstoffe in **aerobem** Milieu (*Teeter und Meyerhoff, 2003; Heberer et al., 2004; Oller et al., 2011; Topp et al., 2013; Masse et al., 2014; UBA, 2014; Pan und Chu, 2016; Taheran et al., 2016; Koba et al., 2017; Selvam und Wong, 2017; Achermann et al., 2018; Achermann, 2019; Reis et al., 2020 I und II*). Eine entsprechende aerobe Gärrestaufbereitung erscheint also sinnvoll und notwendig. Aufgrund der strukturellen Komplexität der Substanzen ist eine Vielzahl von theoretischen mikrobiologischen Abbaupfaden möglich, wodurch zahlreiche chemische Verbindungen als Metaboliten denkbar sind. Die „anaerobe Behandlung“ der Antibiotika in der Biogasanlage, welche sozusagen als Nebeneffekt automatisch erfolgen könnte, könnte sich zumindest als Chance zur Teileeliminierung im Bioenergiesystem erweisen und damit einen wichtigen Baustein zur Vermeidung von Folgeschäden darstellen, wird aber diesem Anspruch nicht gerecht (*Mogensen et al., 2003; Carballa et al., 2007; Alvarez et al., 2010; Spielmeyer, 2019*).

Antibiotika und deren Abbauprodukte in den Umweltkompartimenten bergen aufgrund nicht kalkulierbarer Restkonzentrationen ein schwer abzuschätzendes Gefahrenrisiko im Hinblick auf mögliche human-pathologische und ökosystemare Spätfolgen (*Thiele-Bruhn, 2003; Boxall*

et al., 2004; Sarmah et al., 2006; Kools et al., 2008; Kümmerer, 2004, 2008, 2010; Martinez, 2009; Bottoni et al., 2010; Hammesfahr et al., 2011; Kotzerke et al., 2011; Heuer et al., 2011b; Marshall und Levy, 2011; Forsberg et al., 2012; Forslund et al., 2013; Jechalke et al., 2013; Laxminarayan et al., 2013; Aiken et al., 2014; Allen et al., 2014; Gough et al., 2014; Jechalke et al., 2014a; Jechalke et al., 2014b; UBA, 2014; WHO, 2015; Woolhouse et al., 2015; Bengtsson-Palme et al., 2015; UBA, 2018, 2019; Boxall, 2019).

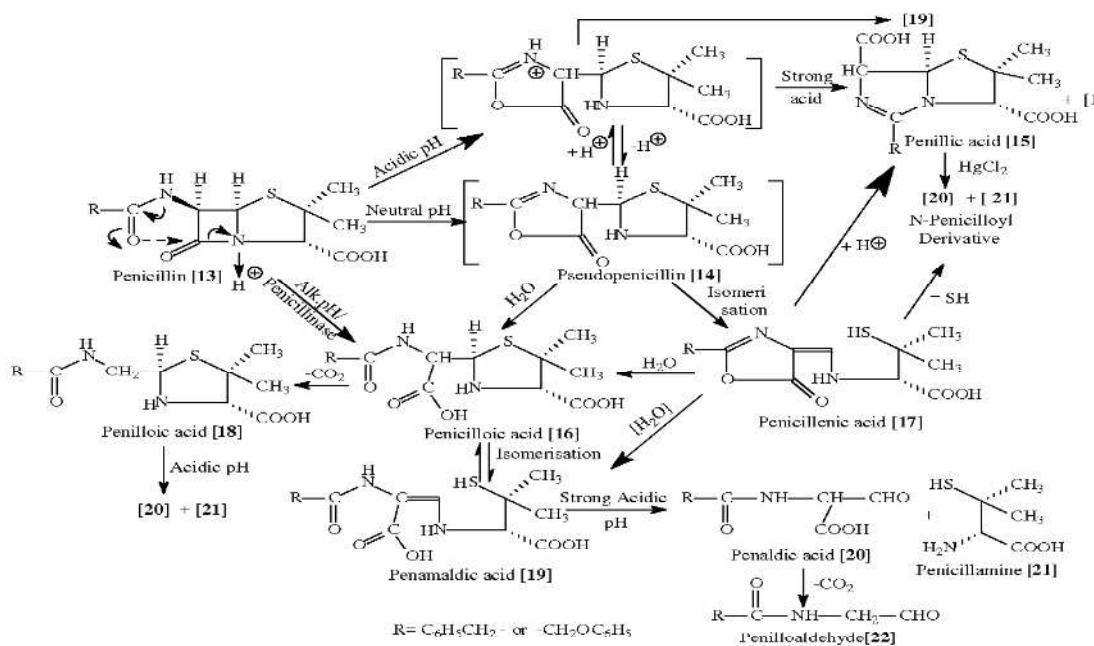


Figure 4. Pathways of degradation of penicillin in acidic and alkaline conditions.

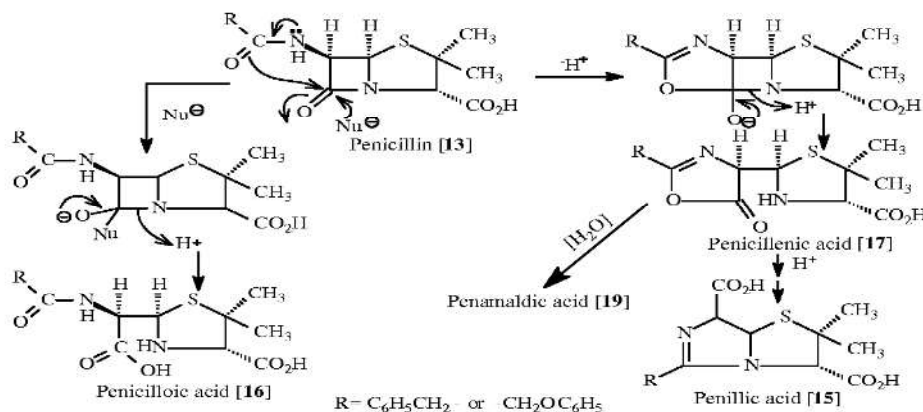


Abbildung 2: Biochemische Abbauwege der β-Lactam-Antibiotika

Spezies-übergreifende Auswirkungen können in Form von Schädigungen der Nahrungsnetze niederer Organismengruppen (in Boden, Grundwasser) bis hin zum Auftreten von (Multi)-Resistenzen von Mikroorganismen unverkennbare Resultate des Anreicherungsprozesses derartiger Substanzen sein (Forsberg et al., 2012; Woolhouse und Ward, 2013; Llor und Bjerrum, 2014; Moyaert et al., 2014; Woolhouse et al., 2014; Zhuang et al., 2015; Zhou et al., 2017; UBA, 2018; Carter und Kinney, 2018; Boxall, 2019; Galera-Laporta und Garcia-Ojalvo, 2020).

Teilweise herrscht große Verunsicherung, eine Relativierung und Versachlichung des Problems ist dringend geboten. Hierzu sollte das Projekt beitragen. Das Antibiotika-Monitoring in Thüringen konnte zeigen, dass die Belastungen in Wirtschaftsdüngern hauptsächlich durch *Tetracycline*, *Sulfonamide* und *Lincomycin* gegeben sind, wobei Schweinegülle und Geflügelkot die höchsten Konzentrationen aufwiesen (Tolzin-Banasch et al., 2015). Die Verbreitung von Resistenzgenen in der Umwelt und der (zumindest bei Jungpflanzen) nachgewiesene Transfer von Antibiotika aus dem Boden via Wurzel in die oberirdischen Pflanzenteile oder sogar direkt in naheliegende Grundwasserleiter stellen aktuelle Herausforderungen für die Gesellschaft, die Wissenschaft und die Agrarbetriebe dar (Kümmerer, 2004; Kumar et al., 2005; Boxall et al., 2006; Grote et al., 2007; Schwake-Anduschus et al., 2009; EC, 2010; Gutierrez et al., 2010; BfR, 2011; Jechalke et al., 2013; Trevisi et al., 2014; Tolzin-Banasch et al., 2015; Boxall, 2019; Thiele-Bruhn, 2019).

Die *European Medicines Agency* (EMA) hat im Jahre 2008 für die Zulassung neuer Tierarzneimittel einen umweltrelevanten Schwellenwert nach Gülleausbringung von 0,1 mg/kg Boden festgelegt. Insgesamt ist die Problematik wissenschaftlich nach wie vor unzureichend bearbeitet. Analytische Methoden zur Antibiotikabestimmung inkl. ihrer Metabolite und Transformationsprodukte in den verschiedensten Umweltmatrices sind noch nicht harmonisiert bzw. standardisiert und müssen aufgrund der chemischen Eigenschaften der einzelnen Wirkstoffe bzw. -klassen zur exakten Quantifizierung weiter entwickelt werden (Perez-Carrera et al., 2010; Bottoni et al., 2010; Panzeri et al., 2013; Berendsen et al., 2015; Jindal et al., 2015; Tolzin-Banasch et al., 2015; Boix et al., 2019; Zühlke, 2019; Thiele-Bruhn, 2019).

2 Zielstellung

Im Projekt ABIOTEC II sollte aufbauend auf ABIOTEC (I) die analytische Methodik für die Bestimmung antibiotischer Substanzen, insbesondere deren Metaboliten und Transformationsprodukte in Wirtschaftsdünger weiterentwickelt und validiert werden. Dabei standen vor allem die Wirkstoffgruppen β -Lactame und Fluorchinolone im Fokus der Untersuchungen. Die innovative Analytik als notwendige Voraussetzung für den Nachweis des Abbaus dieser Substanzen im Rahmen neuartiger Verfahrensansätze zur nachhaltigen Ressourcenverwendung sollte über den kleintechnischen Maßstab hinaus entwickelt und erprobt werden. Für eine sichere Abbaubilanzierung antibiotischer Substanzen durch Input- und Output-Messungen inklusive der wichtigsten Metaboliten sollte mit der weiterentwickelten Analytik ein wichtiger Beitrag geleistet werden.

Die Fortführung des ökologisch ausgerichteten Projekts sollte dabei für die Entwicklung innovativer „low tech“- und „low cost“- Verfahrensansätze zum Abbau von Antibiotika in Wirtschaftsdünger im Sinne ihrer späteren Überführung in den großtechnischen Pilotmaßstab dienen, und eine adäquate reproduzierbare und sichere Analytik bereitstellen.

Das beantragte Projekt sollte in zwei Phasen ablaufen:

Innerhalb der ersten Phase sollte die für die unterschiedlichen Düngematrizes in ABIOTEC (I) etablierte analytische Bestimmungsmethode hinsichtlich der Metaboliten bzw. Transformationsprodukte mittels HR-LCMS weiterentwickelt werden. Für Antibiotika aus der Gruppe der β -Lactame (gut abbaubar) bzw. Fluorchinolone (schwer abbaubar) waren die potentiellen Metaboliten und Transformationsprodukte zu ermitteln.

Die zu den Versuchen zum Abbau bzw. der Transformation der antibiotischen Stoffe notwendige Analytik sollte schließlich zum in ABIOTEC (I) entwickelten Normentwurf beitragen.

Die Untersuchungen mittels kultureller Verfahren sollten wesentliche Veränderungen des mikrobiellen Spektrums aufzeigen. Zusammen mit den ggf. vorhandenen Resistenzgenen ergibt dies eine erweiterte Betrachtung des potentiellen Risikos für den Eintrag von Resistenzen durch Gülle, Stallmist und Gärprodukte. Dies ist als Bestandteil der Handlungsoptionen des UBA von Bedeutung (UBA, 2018).

Mit Projektphase 2 sollten die optimierten verfahrenstechnischen und in der Praxis umsetzbaren Ansätze für den Abbau von Antibiotika in Wirtschaftsdünger für den Einsatz in landwirtschaftlichen Unternehmen im klein- bzw. halbertechnischen Maßstab vorbereitet werden.

Eine wesentliche Basis zur Reduzierung antibiotisch wirksamer Substanzen in den Verteilungspfaden Boden und Grundwasser wird gelegt. Damit soll eine im landwirtschaftlichen Betrieb anwendbare Lösung für den Abbau antibiotisch wirkender Substanzen zur Praxisreife geführt werden. Gleichzeitig wird eine praktikable Prüfroutine zur Hygienisierung erarbeitet.

Erstmalig soll ein Verfahren zur Entwicklung kommen, das gezielt zur Senkung der Antibiotika in Wirtschaftsdünger und bei ihrer Ausbringung in die natürlichen Böden beiträgt und gleichzeitig die Nutzbarkeit der im Stoffstrom enthaltenen Nährstoffe verbessert. Die einzelnen Verfahrensprozesse stellen dabei eine quasi dynamische Lagerungsoptimierung dar. Das geplante Vorhaben soll in Folge zu einem praxisnahen Verfahren der Behandlung von Gärresten, Fest- und Flüssigmist führen. Bei der Umsetzung der Verfahrensschritte Vergärung, Biofiltration und Bioremediation der Düngematrizes werden die mit Risiken behafteten Prozesse der Lagerung, Biomassekonversion, Hygienisierung, Bioremediation und Ausbringung in geeigneter Weise auf einander abgestimmt, sich ergänzend angewendet und genutzt.

Verschiedene wissenschaftliche Grundlagenerkenntnisse aus der Biotechnologie, Siedlungswasser- und Abfallwirtschaft, der Bodenmikrobiologie und -sanierung, sollen in praktikabler Weise angepasst und weiterentwickelt werden, damit die Agrarbetriebe zukünftig in Eigenregie mit wirtschaftlich vertretbarem Aufwand die betriebseigenen Dünger in hygienisch und toxikologisch sicherer und geeigneter Weise behandeln, veredeln und schließlich innerhalb des geschlossenen betrieblichen Kreislaufes ausbringen können. Das nährstoffseitige Potenzial soll dabei erhalten, stabilisiert und Nährstoffverluste und Umweltrisiken im Sinne des **Boden- und Gewässerschutzes** vermieden werden.

3 Material und Methoden

3.1 Aktualisierung der Antibiotika-Recherche

Im Rahmen des Forschungsprojekts sollte die Aktualisierung zu den real eingesetzten Antibiotika in der Tierhaltung in Ergänzung zur Recherche in *Abiotec I* als wichtige Aufgabe zu Projektbeginn stehen. Aktuelle Veröffentlichungen des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), des Umweltbundesamtes (UBA), weiterer Bundesbehörden bzw. -institutionen, dem Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz (TLV), als auch (internationale) Fachpublikationen zu analytischen Methoden, dem tierspezifischen Einsatz der Veterinärantibiotika und ihres Verhaltens in den verschiedenen Umweltkompartimenten wurden berücksichtigt.

Ein Schwerpunkt der Recherchen war die anonyme Befragung von praktizierenden Tierärzten und tierhaltenden Agrarbetrieben sowie vertrauliche persönliche Gespräche, um ein möglichst reales Bild der Anwendungspraxis von Veterinärantibiotika in Thüringen zu erhalten.

3.2 Auswahl der antibiotischen Substanzen

Mit der aktualisierten Recherche zum Einsatz der Veterinärantibiotika in der Praxis (Schwerpunkt Thüringen) sowie den Arbeiten und Erfahrungen aus *Abiotec I* wurde eine wichtige Basis für die gezielte Auswahl der Einzelsubstanzen gelegt. In besonderer Weise hilfreich und unterstützend war das seitens der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft (jetzt TLLLR) in den Jahren 2010 - 2013 erfolgte „Antibiotikamonitoring“ und die enge kooperative Zusammenarbeit und Abstimmung im Rahmen der Projekttreffen und darüber hinaus.

Aus den Antibiotikaklassen wurden im Rahmen der Durchführung der Abbauprobe und weiteren Verfahrensentwicklung die *Penicilline* als leicht abbaubare Substanzen sowie die *Fluorchinolone* als schwer abbaubare Wirkstoffe ausgewählt (vgl. Tab. 3.3.2).

3.3 Weiterentwicklung der LC-MS – Messmethodik

3.3.1 Theoretische Vorbetrachtung und Recherche

Als Grundlage zur chemisch- und bioanalytischen Begleitung des Projekts *Abiotec II* wurden, basierend auf den Erkenntnissen der Vorläuferprojekte *Abiotec I* und *Ameditec*, zunächst retrospektive Fragestellungen aufgegriffen und deren Ergebnisse evaluiert. Darauf aufbauend wurden die analytischen Verfahren sowie experimentellen Planungen entworfen, welche für die Beantwortung der Arbeitshypothesen praktikabel erschienen.

Neben der quantitativen Untersuchung von veterinärpharmazeutischen Spurenstoffen sowie deren Transformationsprodukten in komplexen Umweltmatrices wurden im Rahmen des Projekts initiale Untersuchungen des Bodenmikrobioms mittels molekularbiologischer Methoden angestellt. Die Zielstellung hierbei war es, die bestehenden Methodiken zu spezialisieren und sowie klassische Verfahren durch moderne analytische Ansätze zu modifizieren.

3.3.2 Analytik antibiotischer Veterinärpharmaka und Probenmatrices

Um Abbau- und Umwandlungsprozesse von Antibiotika während eines agrartechnologischen Verfahrens nachvollziehen zu können, müssen praxisrelevante Substanzklassen definiert werden, welche neben ihrer Bedeutung für reale Anwendungsfälle vor allem aus Sicht der chemischen Analytik durch ein valides und reproduzierbares Messverfahren zugänglich sind.

Im vorliegenden Projekt wurde zunächst, basierend auf den vorangegangenen Erkenntnissen, die üblicherweise angewendete ‚Target-Analytik‘, also die gezielte Messung bekannter Stoffe sowie deren Transformationsprodukte mittels niedrigauflösender Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) angewendet. Hierbei wurde eine Methode zur Probenaufbereitung und -messung zum Nachweis ausgewählter Zielsubstanzen mit möglichst niedrigen Bestimmungsgrenzen optimiert. Aufgrund der Verfügbarkeit von Referenz-standards, der Gegensätzlichkeit ihrer chemischen Eigenschaften, Wirkspektren und der praktischen Bedeutung für die Landwirtschaft wurden zwei Substanzklassen (β -Lactam-Antibiotika/Penicilline und Fluorchinolone) für die Durchführung von Methodenoptimierung sowie Anwendungen in praktischen Untersuchungen ausgewählt.



Abbildung 3.3.2: Hochleistungsflüssigchromatographie in Kopplung mit Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS) Thermo Scientific Ultimate 3000 mit Sciex API 4000

Tabelle 3.3.2: Übersicht der eingesetzten Referenzstandardsubstanzen (Antibiotika, Metaboliten und Transformationsprodukte)

β-Lactam-Antibiotika	
Bezeichnung	CAS
Benzylpenicillin (Penicillin G)	61-33-6
Phenoxymethylpenicillin Penicillin V	87-08-1
Amoxicillin	26787-78-0
Ampicillin	69-53-4
Cloxacillin	61-72-3
Dicloxacillin	3116-76-5
Oxacillin	66-79-5
β-Lactam-Metaboliten und Transformationsprodukte	
2-Aminoadipinsäure	542-32-5
6-Aminopenicillansäure (6-APA)	551-16-6
Phenoxymethylpenicilloinsäure	201023-12-3
Penicillamin	52-67-5
Penicillamin-Disulfid	20902-45-8
(4-Hydroxyphenoxy)-essigsäure	1878-84-8
Phenoxyessigsäure	122-59-8
7-Aminoccephalosporansäure (7-ACA)	957-68-6
Fluorchinolone	
Ciprofloxacin	85721-33-1
Enrofloxacin	93106-60-6
Danofloxacin	112398-08-0
Marbofloxacin	115550-35-1
Norfloxacin	70458-96-7
Ofloxacin	82419-36-1
Fluorchinolon-Metabolite und Transformationsprodukte	
Desethylen-Ciprofloxacin	528851-31-2
Formylciprofloxacin	93594-39-9
Oxociprofloxacin	103237-52-1
Sulfociprofloxacin	105093-21-8
Interne Standards	
Xylazin	7361-61-7
Dichlorprop	120-36-5

Untersuchungen aller Spurenstoffe, deren Metaboliten und Transformationsprodukten, sogenannte Non-Target-Analytik, stellen aufgrund ihrer Komplexität und Vielfältigkeit hohe Anforderungen an Messbedingungen und analytische Ausrüstung. Die hierfür benötigte hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS) zur Untersuchung der Gesamtheit aller Spurenstoffe einer komplexen Probe (Metabolomik) befindet sich zum Zeitpunkt des Projektabschlusses im Status der kontinuierlichen Weiterentwicklung und wird im Zuge zukünftiger Untersuchungen eine primäre Funktion einnehmen. Das hierzu vorgesehene Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometer (Q-TOF) und die zugehörige Probenaufbereitung befinden sich derzeit im Prozess der Optimierung.

Neben den zu untersuchenden Substanzen ist die Beschaffenheit der Probenmatrix von besonderer Bedeutung für Probenvor- und aufbereitung (Zhang *et al.*, 2021). Zusätzlich zu den bereits untersuchten Wirtschaftsdüngermatrizes (Schweine- und Rindergülle, Hühner-trockenkot, Festmist) wurde das Verfahren zur Extraktion für weitere Probenarten etabliert. Neben Gärrestproben aus Fermentationsprozessen wurden zusätzlich Bodensubstrate der beprobten Ackerparzellen aufgenommen, um Transformationsprozesse der antibiotischen Substanzen in realen Bedingungen untersuchen zu können.

3.3.3 *Probenvorbereitung und Extraktion*

Das frische Probenmaterial wird zunächst lyophilisiert (SRK Lyo GT2) und mittels Kreuzschlagmühle homogenisiert. Anschließend wird 1 g Trockenmasse eingewogen und mit internen Standards (1 µg/g TM) versetzt. Die Extraktion beginnt mit der Zugabe von 2 mL McIlvaine-EDTA-Lösung (Citrat-Phosphat-Puffer mit EDTA, 200 mM Na₂HPO₄, 100 mM Zitronensäure, pH 4,0 + 100 mM EDTA) und 8 mL Acetonitril (MeCN) und anschließend vortexen. Es folgt die Zugabe von 800 mg Na₂SO₄ und 200 mg NaCl, erneutes vortexen und schütteln der Ansätze mittels Orbitalschüttler (15 min, 300 rpm) sowie zusätzlich Ultraschallextraktion (10 min). Nach der Zentrifugation (10 min, 4000 × g) werden 1,5 mL des Überstandes in ein Mikrozentrifugenröhrchen, in dem 25 mg C18-Sorbens (Chromabond, Macherey-Nagel) und 50 mg Na₂SO₄ vorgelegt sind, überführt, erneut gevortext, geschüttelt (10 min, 300 rpm) und abzentrifugiert (10 min, 14000 × g). Vom Überstand wird 1 mL in ein Flachbodenglas überführt und unter N₂-Strom im Heizblock (35 °C) zur vollständigen Trocknung eingengt. Durch Zugabe von 1 mL Eluenten-Mix (HPLC-Eluentengemisch) wird die Probe durch vortexen resuspendiert und in eine HPLC-Probenvial überführt.

3.3.4 *Flüssigchromatographisches Probentrennverfahren mittels hydrophiler Interaktionschromatographie (HILIC-HPLC)*

Aufgrund der physiko-chemischen Eigenschaften der gewählten Analyten wurde ein chromatographisches Trennverfahren erprobt, welches mit einer spezifischen Beschaffenheit diesen Attributen Rechnung trägt. Mittels der ‚Hydrophilic Interaction Chromatography‘ (HILIC) werden in einer der Normalphasen-Chromatographie ähnlichen Art, sehr polare Analyten unter wässrigen Bedingungen voneinander getrennt. Dies stellt gerade bei der Untersuchung von sehr kleinen polaren Molekülen wie Metaboliten und Transformationsprodukten einen Vorteil gegenüber der klassischen Reversed-Phase dar (Schiesel *et al.*, 2010). Zur Etablierung eines HPLC-Gradientenprogramms mit angepassten Eluenten wurden zahlreiche Testmessungen mit Referenzstandardmessungen durchgeführt und eine optimierte Methode entwickelt.

Tabelle 3.3.4a: Übersicht der chromatographischen Methode und Messungsparameter

Thermo Scientific Ultimate 3000 (LPG-3400SD, WPS-3000, TCC-3100)		
Sciex API 4000 (Analyst 1.6.3)		
SeQuant ZIC-HILIC 5µm 200A 150x2.1mm		
SeQuant ZIC-HILIC Guard 20x2.1 mm		
Eluent A: 40 mM NH ₄ -Formiat in H ₂ O, pH 3,0		Eluent B: 40 mM NH ₄ -Formiat in MeCN
T _C = 25 °C		IV = 5 µL
<i>Zeit min</i>	<i>Fluss µL/min</i>	<i>%B</i>
0	250	97
2	250	97
12	250	35
13	400	97
20	400	97

Tabelle 3.3.4b: Parameter der chromatographischen Methodenentwicklung

Bezeichnung	RT	R ²	LOQ µg/L
2-Aminoadipinsäure	3,15	0,9967	0,01
6-Aminopenicillansäure	7,03	0,9969	0,2
Phenoxymethylpenicillinsäure	1,76	0,9979	0,05
Penicillamin	1,75	0,9993	0,05
Penicillamin-Disulfid	12,75	0,993	0,4
Formylciprofloxacin	1,76	0,9951	0,05
Desethylen Ciprofloxacin	6,46	0,9976	0,1
Sulfociprofloxacin	2,4	0,9929	0,01
Oxociprofloxacin	1,88	0,9966	0,2
Penicillin G	1,74	0,9987	0,01
Penicillin V	1,67	0,992	0,01
Ciprofloxacin	5,4	0,9983	0,05
Danofloxacin	5,85	0,9975	0,05
Marbofloxacin	5,15	0,9973	0,01
Norfloxacin	5,48	0,996	0,05
Ofloxacin	5,01	0,9934	0,01
Amoxicillin	10,9	0,9681	1
Ampicillin	9,56	0,9847	0,05
Cloxacillin	1,59	0,9944	0,1
Dicloxacillin	1,75	0,9933	0,05
Oxacillin	1,6	0,9931	0,01
Enrofloxacin	4,49	0,9938	0,01
4-Hydroxyphenoxyessigsäure	3,65	0,9943	0,05
Phenoxyessigsäure	2,18	0,9913	0,05
RT – Retentionszeit			
R ² - Bestimmtheitsmaß Kalibrierung			
LOQ - Bestimmungsgrenze			

3.3.5 Massenspektrometrische Detektion der Analyten

Für die massenspektrometrische Detektion wurden mittels Referenzstandards der in *Tabelle 3.3.5* aufgeführten Analyten Optimierungen der messspezifischen Parameter vorgenommen. Aufgrund der variierenden chemischen Eigenschaften wurden für jeden Wirkstoff spezifische Geräteparameter aufgenommen, um eine optimierte und sensitive Detektion zu gewährleisten. Die Messungen erfolgten im Multiple-Reaction-Monitoring (MRM) und mittels Polarity-Switching (Polaritätswechsel der Ionisierungsspannung), um zu gewährleisten, dass alle Analyten der komplexen Proben in reproduzierbarer Weise mit höchstmöglicher Selektivität und Sensitivität detektiert werden können.

Tabelle 3.3.5: Massenübergänge der MRM-Messung der untersuchten Analyten

Analyt	ESI +/-	Precursor-Ion		Produkt-Ion
β-Lactam-Antibiotika, inkl. Metaboliten				
Penicillin G	+	335,014	→	160,1
			→	176
Penicillin V	+	351,059	→	229,3
			→	257,2
Amoxicillin	+	366,091	→	349
			→	114
Ampicillin	+	350,061	→	106,2
			→	192
Cloxacillin	+	435,966	→	178
			→	220
Dicloxacillin	+	469,814	→	160
Oxacillin	+	402,101	→	144
			→	186,1
2-Aminoadipinsäure	+	160,107	→	80,2
			→	143,9
6-Aminopenicillansäure	+	217,067	→	189
			→	114,1
Phenoxymethylpenicillinsäure	+	369,065	→	160,1
			→	325,1
Penicillamin	+	148,033	→	101,9
			→	131
Penicillamin-Disulfid	+	297,155	→	179,7
			→	106,7
7-Aminocephalosporansäure	-	271,181	→	211,1
			→	59,3
4-Hydroxyphenoxyessigsäure	-	167,16	→	109,1
			→	123,2
Phenoxyessigsäure	-	151,085	→	93,1
			→	107,3
Fluorchinolone, inkl. Metaboliten				
Ciprofloxacin	+	332,054	→	314,3
			→	288,2

Danofloxacin	+	358,918	→	341,3
			→	82,2
Marbofloxacin	+	363,007	→	72,3
			→	320,3
Norfloxacin	+	320,106	→	302,2
			→	276,3
Ofloxacin	+	361,951	→	318,2
			→	261,2
Enrofloxacin	+	360,019	→	316,3
			→	203,2
Formylciprofloxacin	+	359,964	→	230,3
			→	215,1
Desethylen Ciprofloxacin	+	306,039	→	288,3
			→	217,2
Sulfociprofloxacin	+	412,005	→	332,2
			→	314,3
Oxociprofloxacin	+	346,094	→	328,2
			→	217,1
Interne Standards				
IS Xylazin	+	220,957	→	90,1
			→	163,8
IS Dichlorprop	-	233,054	→	161
			→	125,1

3.3.6 Auswahl eines geeigneten Sorbens für die Probenextraktion

Bestimmung der Wiederfindungsraten bei gespikten Proben

Das im Rahmen der Extraktion verwendete Sorbens wurde mittels gespikter Wirtschaftsdüngerproben auf seine Eignung für die dispersive Festphasenextraktion (dSPE) beprobt. Zur Bestimmung der prozentualen Wiederfindungsraten wurden definierte Konzentrationen der Targetanalyten auf unterschiedliche Düngermatrizes aufgebracht, homogenisiert und im Anschluss unter Verwendung zweier unterschiedlicher SPE-Sorbentien extrahiert und quantifiziert.

Um Überbefunde anhand von Metabolisierungsprozessen auszuschließen, wurden die Ansätze entweder nur mit antibiotischen Referenzstandards dotiert oder ausschließlich mit den zugehörigen Metaboliten. Da für einige Metaboliten und Transformationsprodukte Referenzstandards nur in geringen Mengen verfügbar waren, wurde aus kostenökonomischen Gesichtspunkten auf eine Dotierung verzichtet. Als Matrix wurden die gängigen Wirtschaftsdünger Rindergülle, Schweinegülle, Hühnertrockenkot und Gärreste aus Fermentationsprozessen verwendet. Diese wurden vorab darauf überprüft, ob eine Hintergrundbelastung mit antibiotischen Substanzen vorlag, um einen Blindwert oder eine Kreuzkontamination auszuschließen. Verwendet wurden zwei SPE-Sorbentmaterialien (C18 und NH₂, Chromabond, Macherey-Nagel) mit komplementären Eigenschaften.

C18	- Octadecyl-modifizierte Kieselgelphase ohne Endcapping - besitzt freie Silanolgruppen (SiOH), die sekundäre Wechselwirkungen mit polaren Gruppen des Analyten ermöglichen
NH ₂	- Amino-modifizierte Kieselgelphase - Polarer, schwacher Anionenaustauscher

Die eingesetzten Substanzen wurden je nach Verfügbarkeit und analytischer Zugänglichkeit in variierenden Zielkonzentrationen eingesetzt. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung extrahiert und anschließend doppelt gemessen, sodass sich pro Probe vier Messpunkte ergeben.

	Originalsubstanzen	Metabolite/Transformationsprodukte
β-Lactam	20 µg/kg	20 µg/kg
Fluorchinolone	10 µg/kg	5 µg/kg

Die detaillierten Ergebnisse der Extraktionsversuche können den Tabellen im *Anhang 1* entnommen werden. Aufgrund der höheren Wiederfindungsraten und der breiteren Eignung bei der Verwendung als Extraktionssorbens wurde für die Probenvorbereitung von Proben mit unbekannter Belastung das C18-SPE-Sorbens verwendet.

3.4 Verfahrenstechnik - Verfahrensentwicklung und Abbauversuche

3.4.1 Ansatz und Durchführung von kleintechnischen und Feldversuchen

Ein grundlegender Projektinhalt war die Durchführung von praxisnahen Versuchsaufbauten mit hohem Anwendungsbezug zur Erprobung der verfahrenstechnischen Ansätze zu Abbau- und Umwandlungsprozessen antibiotischer Veterinärpharmaka. Zusätzlich sollten erstmals initiale Untersuchungen zur Auswirkung von Abbau- und Transformationsprodukten auf das Bodenmikrobiom sowie das Resistenzverhalten angestellt werden. Hierzu wurden zwei Arten von verfahrenstechnischen Ansätzen in anwendungsnahen Versuchsreihen durchgeführt. Es wurden Parzellenversuche unter Realbedingungen in Zusammenarbeit mit den landwirtschaftlichen Betrieben erstellt und beprobt und zusätzlich im labortechnischen Maßstab unter standardisierten Bedingungen Reaktionsgefäße (ca. 15 L Volumen) mit dem Ziel der molekularbiologischen Methodenentwicklung angesetzt.

3.4.2 Parzellenversuche

Die Übertragung und Anwendung der Erkenntnisse aus den labortechnischen Versuchsaufbauten erfolgte in Kooperation mit zwei Agrarbetrieben und umfasste Untersuchungen der Praktikabilität der Analysenmethodik sowie das Ab- und Umwandlungsverhalten der Veterinärpharmaka bei Freilandbedingungen unter dem Einfluss biotischer Faktoren und realer Bodeneigenschaften. Die Simulation eines praxisnahen Verfahrens wurde anhand von Versuchspartzen an beiden Standorten erprobt (*Abb. 3.4.2c*).

Tabelle 3.4.2: Parzellenaufbau und -beprobung der Freilandversuche

Betrieb	Pflanzenart	Parzelle- bzw. Probenbezeichnung
AG Diedorf (AGD)	kulturfrei	Kontrollparzelle Rindergärrest ohne Dotierung
		Versuchsparzelle Rindergärrest + Stroh dotiert
		Versuchsparzelle Rindergärrest + Holzmehl dotiert
	Mais	Kontrollparzelle Rindergärrest ohne Dotierung
		Versuchsparzelle Rindergärrest dotiert
		Versuchsparzelle Rindergärrest dotiert + Stroh
MPG Westhausen (WH)	Raps	Kontrollparzelle Rindergärrest ohne Dotierung
		Versuchsparzelle Rindergärrest dotiert
		Versuchsparzelle Rindergärrest dotiert + Stroh
	allgemein	Kontinuierliche Betreuung der Parzellen/Kulturen: Bodenlockerung, Unkrautfreihaltung, ggf. Bewässerung

Zum Ansetzen dotierter Wirtschaftsdüngerproben wurden zunächst die relative Feuchte bzw. die Trockenmasse verschiedene Arten Dünger bestimmt. Hierzu wurden mittels Feuchte- waage Schweinegülle, Rindergülle, Rinderfestmist, Hühnertrockenkot und Gärrest, jeweils mit und ohne Beimengungen organischen Materials (Stroh, Holzmehl, Faserpflanzen), verwendet, um anhand der Trockenmasse (TM) eine definierte Bezugsgröße zur Berechnung der Standard- einwaagen und damit auch ausgebrachten Mengen der verschiedenen Antibiotika zu erhalten. Um eine Zielkonzentration von 50 µg/kg TM einzustellen, wurden Referenz-standards der Antibiotika Penicillin G, Penicillin V, Amoxicillin, Ampicillin, Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, Ciprofloxacin und Ofloxacin in einem Ansatz eingewogen und kurz vor Zugabe zur Düngermatrix in einem Lösungsmittel- Wassergemisch (DMSO:RW 8:2) gelöst und anschließend unter kontinuierlichem Rühren dem Spikeansatz zugegeben. Zu einem Dotier-ansatz (50 L) wurden somit 1 L Dotierlösung beigemischt.



Abbildung 3.4.2a: Gärrestdotierung

Aufgrund der Verfügbarkeit in den Agrarbetrieben wurden vorrangig Rindergülle und Gärrestansätze erstellt. Die Ansätze wurden im Anschluss zur Dotierung von Feldparzellen verwendet. Auf diese Weise konnten unterschiedliche Versuchsparameter unter realen Bedingungen (Klima, Witterung, Temperatur, Feuchtigkeit, UV-Strahlung) erprobt werden. Alle verwendeten Umweltmatrices (Wirtschaftsdünger, Bodenproben, pflanzliches Material) wurden vor dem Einsatz der Antibiotika auf Kontaminationen bzw. Belastungen überprüft. Es wurden ausschließlich unbehandelte Substrate verwendet. Über den gesamten Zeitraum einer Versuchsreihe hinweg wurden stets die Blindwerte der unbehandelten Böden und

Wirtschaftsdünger sowie der gespikte Ansatz selbst überprüft, um sicherzustellen, dass keine Kontaminationen auftreten bzw. um den natürlichen Umwandlungsprozess im Spikeansatz nachvollziehen zu können. Die Versuchspartellen wurden aus diesem Grund stets einer Dreiteilung unterworfen.

Neben einem Drittel, welches mit einem undotierten Ansatz beaufschlagt wurde, wurde zusätzlich eine Drittel mit dotiertem Ansatz versehen und das letzte Drittel mittels

organischen Additivs oder pflanzlichen Beimengungen versehen, um damit die Auswirkung unter vergleichenden Bedingungen nachvollziehen zu können. Die unbepflanzten Partellen wurden als Vergleich von Stroh und Holzmehl als Additiva geführt.

Die Probenahme erfolgte im Verlauf der Versuchsreihe zu Beginn engmaschig bzw. täglich und wurde mit zunehmendem Verlauf in größeren Intervallen durchgeführt. Aufgrund des Bezugs zum realen Agrarbetrieb wurden die Partellenversuche in Abhängigkeit von Jahreszeiten, Witterungseinflüssen und Fruchtfolgen der Versuchsfelder etabliert.



Abbildung 3.4.2b: Anlegen der unbepflanzten Partellen



Abbildung 3.4.2c: Rapsparzellen (WH, links oben); unbepflanzte Partellen (AGD, rechts oben, links unten); Maisparzellen (AGD, rechts unten)

Die auf diese Weise erhaltenen Proben wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren aufbereitet und mittels HPLC-MS/MS analytisch untersucht. Die Quantifizierung der eingesetzten Antibiotika sowie der entstandenen Metabolite und Transformationsprodukte erfolgte in Doppelbestimmung sowie doppelter Messung. Die erhaltenen Abbaukurven bzw. Bilanzierungen der gebildeten Umwandlungsprodukte können den Abbildungen im Ergebnisteil sowie im Anhang entnommen werden.

3.4.3 Kompostierungs- und Vererdungsversuche – ‚Fassversuche‘

Der Ansatz der Versuchsreihe in Reaktionsgefäßen erfolgte unter dem Gesichtspunkt der Methodenentwicklung für molekularbiologische Analysen. Es sollten, neben der Bilanzierung der chemischen Ab- und Umbauprozesse, vor allem analytische Verfahren zur Untersuchung des Bodenmikrobioms (also der Gesamtheit aller Bodenmikroorganismen) und eventueller Resistenzfaktoren (Resistom) etabliert werden.

Der Ansatz erfolgte analog den Feldversuchen, jedoch unter Bedingungen mit höherer Standardisierung, da unter Laborbedingungen gearbeitet werden konnte. Durch die Normalisierung abiotischer Faktoren wie Temperatur, Feuchte und Ansatzvolumen lassen sich Änderungen im Bereich biotischer Parameter deutlicher nachvollziehen.

Konkret wurden Fassansätze (15 L Volumen) mit Bodenproben, un-/dotiertem Gärrest sowie organischen Additiven (Stroh oder Holzmehl) erstellt. Zum Ansetzen von dotiertem Gärrest (4x2 L) wurden auf die Trockenmasse bezogene Mengen von Referenzstandards eingewogen und in je 200 mL Lösungsmittel-Wassergemisch (DMSO:H₂O 8:2) gelöst.

Die eingesetzten Substanzen Penicillin G, Penicillin V, Ciprofloxacin, Danofloxacin, Marbofloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin, Amoxicillin, Ampicillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, und Oxacillin wurden dabei mit einer Konzentration von 50 µg/kg TM dotiert.

Über einen Versuchszeitraum von 30 Tagen wurden Proben zur chemischen Analytik sowie mikro- und molekularbiologischen Untersuchung entnommen. Die quantitative Analytik der antibiotischen Substanzen erfolgte analog des oben beschriebenen Protokolls. Die Bestimmung der Abbaumessungen erfolgte in Duplikaten. Zusätzlich wurden Proben verwendet, um mittels Realtime-PCR die Veränderung der mikrobiologischen Gesamtheit des Ansatzes zu verfolgen und mit den Ergebnissen der klassischen Kultivierungstechniken abgleichen zu können. Die Ergebnisse der chromatographisch-massenspektrometrischen Quantifizierung (HPLC-MS/MS) sind den Abbildungen im Ergebnisteil und Anhang zu entnehmen.

3.4.4 Entwässerungsversuche

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



Abbildung 3.4.4: Entwässerungs- und Vererdungsbehälter; Behälter mit GR; Behälter mit GR und Zuschlägen

3.5 Molekular- und Mikrobiologische Methoden

3.5.1 Molekularbiologie mittels Realtime-PCR

Um die Fragestellung der mikrobiologischen Gesamtheit einer Probe sowie dem Auftreten von Resistenzen gegenüber den eingesetzten Veterinärantibiotika zu untersuchen, wurde eine bioanalytische Methodik angewendet, welche in der Lage ist selektive und quantitative Aussagen zu treffen. Mit Hilfe der quantitativen Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) ist es möglich anhand genomischer DNA aus Umweltproben sowohl die Zusammensetzung des Mikrobioms als auch das Auftreten spezifischer Resistenzen nachzuvollziehen. Ziel ist es, eine schnelle und präzise Aussage aus den komplexen Umweltproben zu erhalten und damit Erkenntnisse zu gewinnen, die durch konventionelle mikrobiologische Kultivierungstechniken nicht abgedeckt werden können. So lässt sich beispielsweise die Gesamtheit einer Bodenbakterienspezies ermitteln oder das selektive Identifizieren einer Pilzgattung, welche in der Lage ist den Abbau von Xenobiotika zu beschleunigen. Darüber hinaus lässt sich das Auftreten von Resistenzgenen oder Antibiotika-resistenten Mikroorganismen nachweisen und somit die direkte Auswirkung des Einsatzes von Antibiotika nachverfolgen.

Aus diesem Grund ist der Einsatz der qPCR ein unverzichtbares Mittel zur schnellen Identifikation und Quantifizierung bei der bioanalytischen Untersuchung des beprobten Materials.

3.5.2 Definieren von Targets für die qPCR

Um eine aussagekräftige Methode zur Analyse unter Anwendung des qPCR-Verfahrens etablieren zu können, müssen zuerst genetische Targets definiert werden, welche von Interesse für die im Projekt erhobenen Fragestellungen sind. Aus diesem Grund wurden, basierend auf den Erkenntnissen aus mikrobiologischen Bestimmungen der Vorläuferuntersuchungen (Abiotec I, Ameditec) zunächst die am häufigsten nachgewiesenen Mikroorganismenklassen ausgewählt. Da es sich bei den Proben vorrangig um Wirtschaftsdüngermatrizes handelt, traten hierbei typische Vertreter der Fäkalkeime gehäuft auf. Neben den Gattungen *Escherichia* und *Enterococcus* waren zusätzlich ubiquitär verbreitete Bakterien der Gattung *Pseudomonas* nachzuweisen. Basierend darauf wurden Primersets definiert, welche in der Lage sind, sowohl Gattungsspezifische Merkmale nachzuweisen (*Enterococcus* und *E. coli*), als auch selektiv das Auftreten einer Subspezies (*P. fluorescens*).

Tabelle 3.5.2: Primersets für die bioanalytische Untersuchung mittels qPCR

Nr.	Target		Sequenz (5'-3')	T _m °C	Verwendung
1	16S rRNA	For	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	63,5	Bakterielle Gesamt-DNA
1	16S rRNA	Rev	ATTACCGCGGCTGCTGG	57,6	Bakterielle Gesamt-DNA
2	blaTEM	For	TTCCTGTTTTGCTCACCCAG	57,9	β-Lactamase
2	blaTEM	Rev	CTCAAGGATCTTACCGCTGTTG	60,3	β-Lactamase
3	blaCMY	For	CCGCGGCGAAATTAAGC	55,2	β-Lactamase
3	blaCMY	Rev	GCCACTGTTTGCCTGTCAATT	59,8	β-Lactamase
4	qnrA	For	AGGATTTCTACGCCAGGATT	57,9	Quinolon-Resistenz
4	qnrA	Rev	CCGCTTTCAATGAACTGCAA	55,9	Quinolon-Resistenz
5	qnrB	For	CGACGTTCACTGGTTCAATCTC	62,4	Quinolon-Resistenz
5	qnrB	Rev	GCCAAGCCGCTCCATGAG	60,5	Quinolon-Resistenz

6	qnrD	For	CGCTGGAATGGCACTGTGA	58,8	Quinolon-Resistenz
6	qnrD	Rev	GCTCTCCATCCAACCTCACTCC	62,1	Quinolon-Resistenz
7	E. coli sp	For	CATAAGCGTCGCTGCCG	57,6	Escherichia-Spezies
7	E. coli sp	Rev	AAAGAAAGCGTAATAGCTCACTGGTC	61,7	Escherichia-Spezies
8	Pseudomonas sp	For	TCAACTCACCTTCACAGG	53,7	Pseudomonas-Spezies
8	Pseudomonas sp	Rev	AAAGAAAGCGTAATAGCTCACTGGTC	61,7	Pseudomonas-Spezies
9	P. fluorescens	For	CGAGAGCTGATGACGAGTAACT	60,7	P. fluorescens
9	P. fluorescens	Rev	GGGTACGGTTCCTGGTTACC	61,4	P. fluorescens
10	Enterococcus sp	For	AGAAATTCCAAACGAACCTTG	51,2	Enterococcus-Spezies
10	Enterococcus sp	Rev	CAGTGCTCTACCTCCATCATT	57,9	Enterococcus-Spezies

Zusätzlich wurde ein Marker gesucht, welcher in der Lage ist eine Aussage zur quantitativen Gesamtheit der bakteriellen Population einer Probe zu treffen. Hierfür wurde ein Primerset zur Charakterisierung des 16S rRNA Gens herangezogen. Anhand von Sequenzierung dieses Gens (16S rRNA) ist es möglich Aussagen über die taxonomische Verteilung beispielsweise des bakteriellen Bodenmikrobioms zu treffen. Da das 16S rRNA Gen hoch-konservierte Regionen des Bakterien-Ribosoms enthält, lässt es sich zur quantitativen Bestimmung der Gesamtmenge einer Population heranziehen. Unter Verwendung eines Primersets, welches an die hoch-konservierten Regionen in der Nähe des 16S rRNA-Gens binden, wird durch PCR dieser Genabschnitt aller Bakterien einer Probe amplifiziert. Neben der taxonomischen Quali- und Quantifizierung der Probe, stellen Aussagen zu Antibiotikaresistenzen eine zentrale Fragestellung der bioanalytischen Untersuchungen dar. Die eingesetzten Antibiotika stammen aus den Wirkstoffklassen der β -Lactam- und Fluorchinolon-Antibiotika. Der quantitative Nachweis des Auftretens der zugehörigen Resistenzgene stellt den zweiten großen Aspekt der PCR-Analytik dar.

3.5.3 Extraktion von mikrobieller DNA aus Bodenproben

Für die Isolation mikrobieller DNA aus Umweltproben (Boden, Sediment, Kompost, Dünger) wurde ein Extraktions-Kit basierend auf High-Binding-Zentrifugationssäulen eingesetzt (GeneMATRIX Soil DNA Purification Kit, EURx). Als Produkt der Extraktion erhält man eine von Huminstoffen befreite gepoolte DNA-Probe, welche die gesammelte DNA aller Bakterien, Pilze, Protozoen und Algen enthält. Die Probe wird zunächst mechanisch homogenisiert (Glas Beads) und dann mithilfe von verschiedenen Lyse- und Waschschritten fraktioniert aufgereinigt. Die Extraktion erfolgte dem Protokoll des Herstellers folgend. Im Anschluss wurde photometrisch die Menge und Güte der Extrakte bestimmt.

Tabelle 3.5.3: Photometrische Bestimmung von Ausbeute und Reinheit der DNA-Extraktion aus Bodenproben

Proben	Kalk. Konz dsDNA (OD ₂₆₀ x50 µg/ml)	260/280	260/230
	ng/µL	(Soll=1,85-1,88)	(Soll=2,3-2,4)
GR undotiert+Erde+Stroh	19,91	1,52	1,65
GR dotiert+Erde+Stroh	16,59	1,51	1,57
GR dotiert+Erde	21,70	1,58	1,72

GR undotiert+Erde+Holzmehl	19,29	1,34	1,35
GR dotiert+Erde+ Holzmehl	18,85	1,27	1,33
GR dotiert+ Holzmehl	18,44	1,29	1,25

Die dargestellten Werte geben Aufschluss über Menge, Reinheit und Art der Verunreinigung der DNA-Extrakte. Über die OD₂₆₀ kann grob die Ausbeute der isolierten doppelsträngigen DNA errechnet werden. Aus dem Verhältnis OD_{260/280} lässt sich schließen, dass in den Proben eine geringe Kontamination durch Proteinanteil besteht. Deutlicher jedoch ist die Verunreinigungen mit chaotropen Verbindungen (OD_{260/230}), welche für nachfolgende Schritte der PCR-Analytik kritischer sind, da diese zu fehlerhaften Amplifikationen führen können. Hier gilt es, das vorhandene Protokoll zu optimieren, um es besser an die komplexen Bedürfnisse der Aufreinigung aus Boden-Dünger-Mischproben anpassen zu können.

3.5.4 Mikrobiologische Untersuchungen

Um die Effekte der Ausbringung von antimikrobiellen Wirkstoffen zu verfolgen, wurden Veränderungen der mikrobiellen Bodenflora verfolgt. Die Proben aus den Parzellenversuchen und den „Behälterversuchen“ wurden entsprechend der im vorausgegangenen Projekt *Abiotec* erarbeiteten Verfahrensweise untersucht.

Es erfolgte eine variable Verdünnung und anschließende mechanische Homogenisierung. In Stroh-Mischungen wurde eine Abfolge von Mischungen auf Vortex (1 min) und Schüttler (über 30 min) angewandt. Die erhaltenen Suspensionen wurden auf festen Agar-Nährmedien ausgestrichen und bei Temperaturen von 36°C, 30°C bzw. 22 °C kultiviert.

Durch Kultivierung auf Universalmedien (CaSo-, Columbia-Blut-Agar) erfolgte die Bestimmung der aeroben bakteriellen Gesamtkeimzahl. Für die Zählung der Pilze wurde auf Malzextrakt- und Dichloran-Glycerol- Agar kultiviert.

Zur Identifizierung von hygienerelevanten Gruppen wurden jeweils Selektivmedien verwendet: Enterobacteriaceae, darunter speziell *Escherichia coli* (CCA, MacConkey, Rapid-E.coli), Enterokokken (Slanetz-Bartley, Galle-Aesculin), Staphylokokken; sowie anaerob wachsende Vertreter wie Clostridien und Milchsäurebakterien (TSC-, Columbia-).

Für die Differenzierung von Pilzgruppen, inkl. phytopathogene Spezies wurden zusätzlich Subkulturen auf Hafer- und Potato-Dextrose-Agar angelegt.

Zur Abschätzung der Anteile resistenter Bakterien wurden Kolonien isoliert und mittels Agar-Diffusionstest gegen die betrachteten Antibiotika geprüft.

3.6 Wirtschaftlichkeitsbetrachtung

Im Rahmen einer Wirtschaftlichkeitsabschätzung und ausgehend von den Analysen zum Abbau von Antibiotika unter für die Praxis geeigneten Bedingungen wurden verschiedene methodische Ansätze mit Blick auf die Kosten für einen Agrarbetrieb, auch als Basis für weitere Überlegungen und Anpassungen bzw. Optimierungen relevanter verfahrenstechnischer Ansätze erstmals bewertet und auf ihre grundsätzliche Machbarkeit hin überprüft.

3.7 Internationaler Workshop

Am 17. und 18. April 2023 wurde in Weimar der zweite Internationale Workshop zur Thematik der Antibiotika, ihres Nachweises, der Regulierung und ihrer Bewertung in den Räumen der MFPA Weimar durchgeführt. Zahlreiche Forschergruppen im In- und Ausland wurden für den Workshop kontaktiert und eingeladen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Aktualisierte Antibiotika- Recherche

Die nachfolgenden Tabellen zeigen die Ergebnisse aus den persönlichen Befragungen und Recherchen zum Einsatz von Veterinärantibiotika in der Praxis zusammengefasst dargestellt auf. Die Anwendung von Antibiotika bei Schwein und Geflügel wurde gemeinsam betrachtet, da es Parallelen gibt.

Tabelle 1.1- 1: Antibiotika- Einsatz bei Schwein (S) und Geflügel (G) nach Recherche

Wirkstoffgruppe	Wirkstoff	Einsatz	Bemerkungen
Tetracycline	Oxytetracyclin	G + S	
	Doxycyclin	G + S	
	Chlortetracyclin	G + S	
	Tetracyclin	G + S	
Sulfonamide	Trimethoprim + Sulfamethoxazol	Geflügel	
	Sulfachlorpyrazin + Sulfaclozin	Geflügel	
	Sulfaquinoxalin	Geflügel	
Chinolone	Enrofloxacin	G + S	Reserveantibiotikum
	Danofloxacin	Schwein	Reserveantibiotikum
	Marbofloxacin	Schwein	Reserveantibiotikum
	Nalidixinsäure	Schwein	
Makrolide, Pleuromutiline und Lincosamide	Lincomycin	G + S	
	Clindamycin	Schwein	
	Erythromycin	Schwein	relativ häufig
	Tiamulin	Geflügel	
	Tildipirosin	Schwein	
	Tilmicosin	Geflügel	
	Tulathromycin	Schwein	
	Tylosin, Tylan, Tylosin A	G + S	
Penicilline und Cephalosporine	Amoxicillin	G + S	
	Ampicillin	Geflügel	
	Benzylpenicillin (Penic. G) - Procain	G + S	
	Cefquinom	Schwein	Reserveantibiotikum
	Ceftiofur	Schwein	Reserveantibiotikum
Aminoglykoside	Neomycin	G + S	
	Gentamycin	Schwein	Wartezeit essb. Gewebe > 140 Tage
	Spectinomycin	G + S	

Polypeptide	Colistin	G + S	Einsatz abnehmend (Reserveantibiotikum)
Amphenicole	Florfenicol	Schwein	

	sehr häufig verwendete Substanzen
	häufig eingesetzte Substanzen
ohne farbige Untersetzung	weniger häufig verwendete Substanzen

Die beim Schwein wie auch Geflügel häufig eingesetzten Antibiotika gehören mit Ausnahme der Cephalosporine und Chinolone nahezu allen Wirkstoffgruppen an (vgl. Tab. 4.1- 1). Bevorzugt eingesetzt werden verschiedene Tetracykline, Lincosamide, Penicilline, *Colistin*. Ausnahmen bilden die Sulfonamide mit Schwerpunkt Geflügel und Amphenicole (Schwein).

Tabelle 4.1- 2: Antibiotika-Einsatz und Einsatzhäufigkeit bei Rind nach Recherche

Wirkstoffgruppe	Wirkstoff	Einsatzhäufigkeit	
Tetracycline	Oxytetracyclin (-Hydrochlorid)	mittel	
	Oxytetracyclin (-Dihydrat)	mittel	
	Tetracyclin	selten	
Sulfonamide	Trimethoprim + Sulfamethoxazol	mittel	
Chinolone	Enrofloxacin	selten	Reserveantibiotikum
	Marbofloxacin	selten	Reserveantibiotikum
Makrolide, Pleuromutiline, Lincosamide	Lincomycin	mittel	
	Tiamulin	keine Relevanz	keine zugelassenen Präparate
	Tilmicosin	selten	
	Tulathromycin	mittel	
	Tylosin	mittel	
Penicilline und Cephalosporine	Amoxicillin (+ Clavulansäure)	sehr häufig	
	Ampicillin (+ Cloxacillin)	mittel	
	Benzympenicillin (Pen. G) - Procain	sehr häufig	
	Cloxacillin (+ Pen. G)	häufig	
	Oxacillin	häufig	
	Cefoperazon	selten	Reserveantibiotikum
	Cefquinom	selten	Reserveantibiotikum
	Cefapirin (+ Prednisolon)	mittel	1 lokale Mastitispräp., 1 Trockensteller
	Cephalothin	keine Relevanz	keine zugelassenen Präparate
	Cefalexin	mittel	2 lokale Mastitispräp., 1 Trockensteller
	Ceftiofur	selten	Reserveantibiotikum

Aminoglykoside	Gentamicin	keine Relevanz	Wartezeit essb. Gewebe ab 190 Tage
	Kanamycin	mittel	1 lokales Mastitispräparat (Ubrolexin)
	Spectinomycin	selten	2 Injektionspräp. für Kälber zugelassen
Polypeptide	Colistin	selten	
Amphenicole	Florfenicol	sehr häufig	

Antibiotika, die beim Rind verstärkt eingesetzt werden, umfassen insbesondere die Wirkstoffklassen β -Lactame (*Ampicillin*, *Cloxacillin*, *Oxacillin*, *Penicillin G*) und Amphenicole (*Florfenicol*). Tetracycline, Sulfonamide, Aminoglykoside und Makrolide sind in ihrer Anwendung innerhalb der letzten Jahre zurückgegangen (vgl. Tab. 4.1- 2).

Die flächendeckende Erfassung von Verbrauchsmengen ist für eine fachlich fundierte Bewertung des Antibiotikaeinsatzes und den daraus resultierenden Folgen für die Entwicklung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen notwendig. Nach Art. 57 der Europäischen Tierarzneimittelverordnung (EU, 2019/6) sind ab 2024 von allen EU- Mitgliedsstaaten jährlich umfassende Daten zur Antibiotikaaanwendung bei Tieren an die EMA zu übermitteln. So werden bereits in 2023 Daten bzgl. der wichtigsten Lebensmittel liefernden Tierarten (Rind, Schwein, Huhn, Pute) erhoben (EU, 2021). Die weiterhin gültigen Antibiotika- Leitlinien müssen bei der Anwendung von Antibiotika Beachtung finden (BTK, 2015).

Bei der bisherigen jährlichen Antibiotikamengenerfassung in Deutschland ging nicht hervor, welcher Wirkstoff in welcher Menge in die einzelne Tierart/Produktionszweig geflossen ist. Dies war allerdings beim Schwein über das QS Monitoring nachvollziehbar. Ab 2023 gibt es ein Antibiotikamonitoring mit Meldepflicht der jeweiligen Tierarztpraxis für weitere Tierarten u.a. Milchvieh, Mastrinder, Kälber, Mutterkühe ... Dann werden exakte Aussagen möglich, welche Antibiotika in welcher Menge in welche Tiere „geflossen“ sind. Die Festlegung sogenannter „Reserveantibiotika“ hat zu einer Anwendungsreduktion der Substanzen geführt. Sie unterliegen einer Antibiotigrammpflicht. Neue Wirkstoffklassen hat es in den letzten Jahren nicht gegeben und wird es wahrscheinlich auch nicht geben. Die Nutztierhaltung ist im westlichen Europa insgesamt rückläufig.

4.2 Auswahl antibiotischer Substanzen

Die in Tabelle 3.3.2 aufgelisteten Wirkstoffe wurden als typische praxisrelevante Vertreter zweier wichtiger Wirkstoffklassen inkl. ihrer Metaboliten unter den Aspekten der Abbaubarkeit (und Beschaffungskosten) ausgewählt. Die Wirkstoffe der β -Lactame und Fluorchinolone repräsentieren sowohl schwer als auch leicht abbaubare Substanzen und wurden in den verwendeten Dotierlösungen eingesetzt. Der Nachweis einzelner Metaboliten diente sowohl dem Verständnis als auch der näheren Beschreibung der Abbauprozesse.

4.3 Weiterentwicklung der LC-MS – Messmethodik

Untersuchungen aller Spurenstoffe, deren Metaboliten und Transformationsprodukten, sogenannte Non-Target-Analytik, stellen aufgrund ihrer Komplexität und Vielfalt hohe Anforderungen an Messbedingungen und analytische Ausrüstung. Die hierfür benötigte hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS) zur Untersuchung der Gesamtheit aller Spurenstoffe einer komplexen Probe (Metabolomik) ist zum Zeitpunkt des Projektabschlusses im Status der kontinuierlichen Weiterentwicklung und wird im Zuge zukünftiger Untersuchungen eine primäre Funktion einnehmen. Das hierzu vorgesehene Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometer (Q-TOF) und die zugehörige Probenaufbereitung werden derzeit weiter optimiert. Neben den zu untersuchenden Substanzen ist die Beschaffenheit der Probenmatrix von besonderer Bedeutung für Probenvor- und -aufbereitung (Zhang *et al.* 2021). Zusätzlich zu den bereits untersuchten Wirtschaftsdüngermatrizes (Schweine- und Rindergülle, Hühnertrockenkot, Festmist) wurde das Verfahren zur Extraktion für weitere Probenarten etabliert. Neben Gärrestproben aus Fermentationsprozessen wurden zusätzlich Bodensubstrate der beprobten Ackerparzellen aufgenommen, um Transformationsprozesse der antibiotischen Substanzen in realen Bedingungen untersuchen zu können.

4.4 Verfahrenstechnik - Verfahrensentwicklung und Abbauprobversuche

Ein grundsätzliches Problem mit dotiertem Gärrest und dessen Verteilung auf die Versuchspartellen liegt in der homogenen Durchmischung des Gärrests bei der Dotierung einerseits sowie bei der gleichmäßigen Verteilung auf und innerhalb der Bodenmatrix der Partellen. Dabei können unvermeidliche Inhomogenitäten (u.a. „Nesterbildung“ mit höheren Konzentrationen) auftreten, die ggf. bei der Bewertung der Ergebnisse zu berücksichtigen sind.

4.4.1 Partellenversuche WH Raps

Die im Partellenversuch auf Raps nachgewiesenen Antibiotika und ihre Metaboliten bzw. Transformationsprodukte sind in den Abbildungen 4.4.1 (a-f) sowie im Anhang 2 grafisch dargestellt. Im Falle der β -Lactame konnten lediglich die Antibiotika Amoxicillin, Cloxacillin und Oxacillin über die Versuchsdauer nachgewiesen werden bei Restgehalten von Amoxicillin zu Versuchsende, während Penicillin G und V offensichtlich bereits zu Versuchsbeginn metabolisierten. Andererseits stiegen die Gehalte der Metaboliten zu Beginn an, um dann innerhalb weniger Tage sukzessive abzufallen. Amoxicillin erwies sich als relativ stabil.

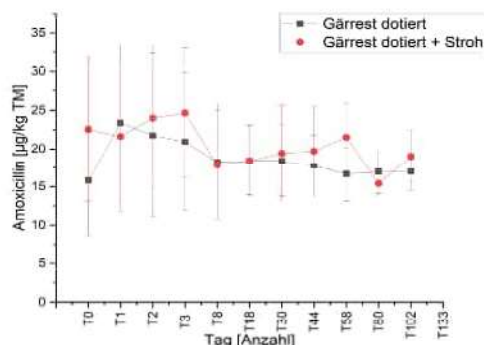


Abbildung 4.4.1a: Amoxicillin-Gehalte der Raps-Partellen

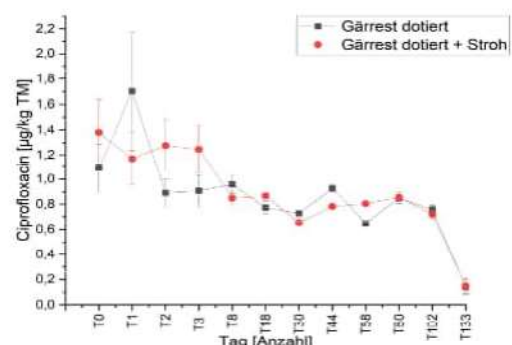


Abbildung 4.4.1b: Ciprofloxacin-Gehalte der Raps-Partellen

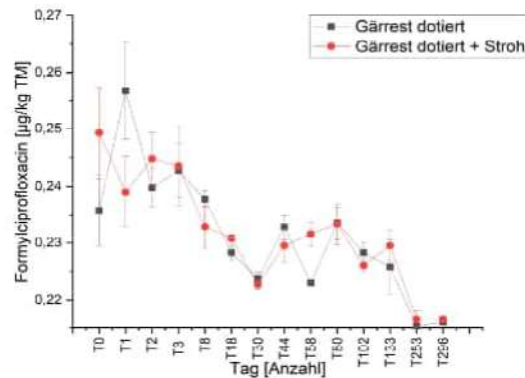
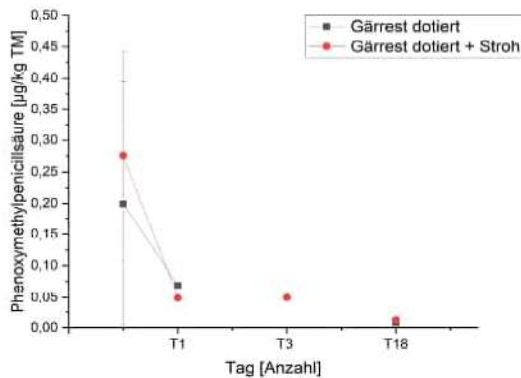


Abb. 4.4.1c: 6-Lactam- Metabolitgehalte der Parzellen

Abb. 4.4.1d: Formylciprofloxacin Gehalte der Parzellen

Die Fluorchinolone verhielten sich in ähnlicher Weise wie die β -Lactame, wobei Dano-, Marbo- und Norfloxacin nicht mehr nachgewiesen werden konnten und offensichtlich bereits zu Versuchsbeginn in Metabolisierungsprozesse integriert waren. Die längerfristige Eliminierung von Ciprofloxacin wird von einem anfänglichen Anstieg und anschließenden Abfall der Metaboliten Formyl- und Oxociprofloxacin begleitet. Zwischenzeitliche Anstiege in den Abbau- Kurven können mit Adsorptionsprozessen der Substanzen an der Matrix sowie partiell inhomogener Durchmischung liegen.

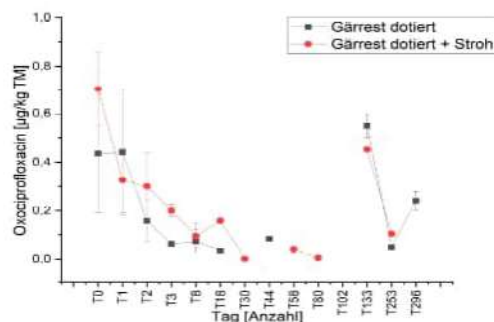
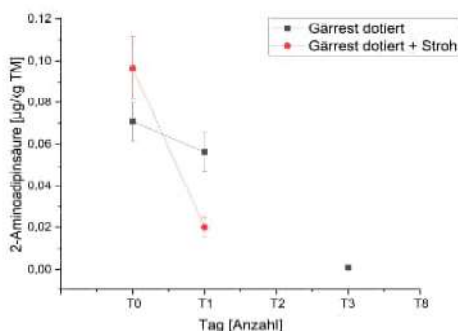


Abb. 4.4.1e: 6-Lactam- Metabolitgehalte der Parzellen

Abb. 4.4.1f: Oxociprofloxacin- Gehalte der Parzellen

Parzellenversuche AGD unbepflanzt

In den Abbildungen 4.4.1(g-n) sowie im Anhang 2 sind die Abbauversuche der Pharmaka und ihrer Metaboliten auf unbepflanzten Parzellen, bei denen der dotierte Gärrest entweder mit Stroh oder Holzmehl als Additiva angereichert wurde, graphisch dargestellt. Dabei konnten weder bei den β -Lactamen noch bei den Fluorchinolonen gravierende Unterschiede im Abbauverhalten gegenüber den beiden Additiva festgestellt werden. Auch hier waren nur einzelne β -Lactame wie Amoxicillin, Cloxacillin und Oxacillin und deren Metaboliten sowie nur die Fluorchinolone Ciprofloxacin und Ofloxacin und einzelne ihrer Metaboliten nachweisbar, sodass von intensiver Metabolisierung der anderen Originalantibiotika ausgegangen werden kann. Die biochemischen Umsetzungen und Metabolisierungen gehen bei den β -Lactamen gegenüber den Fluorchinolonen in wesentlich kürzeren Zeiten vonstatten.

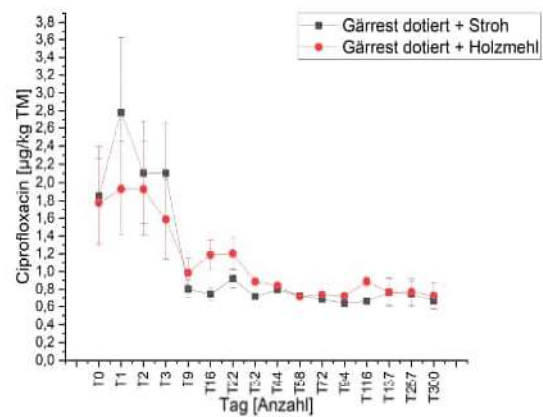
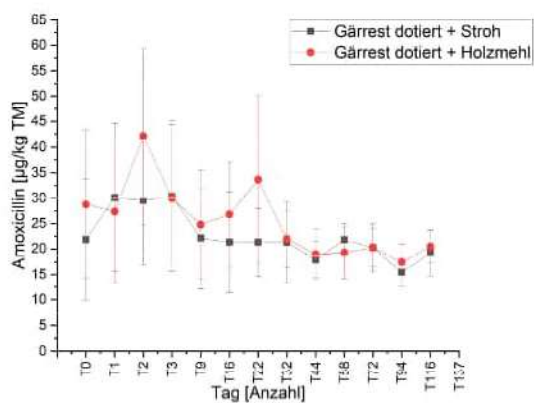


Abb. 4.4.1g: Amoxicillin-Gehalte unbepflanzter Parzellen Abb. 4.4.1h: Ciprofloxacin-Gehalte unbepfl. Parzellen

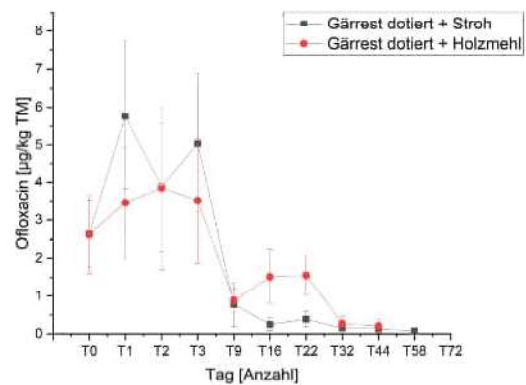
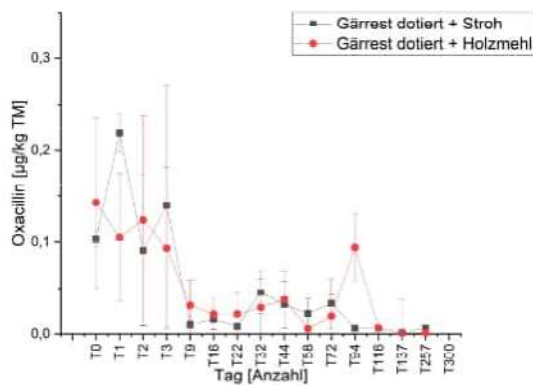


Abb. 4.4.1i: Oxacillin-Gehalte unbepflanzter Parzellen Abb. 4.4.1j: Ofloxacin-Gehalte unbepfl. Parzellen

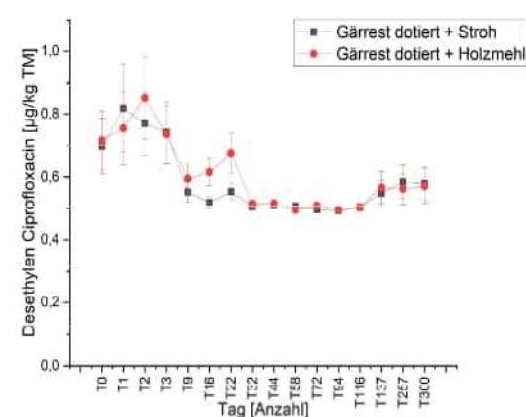
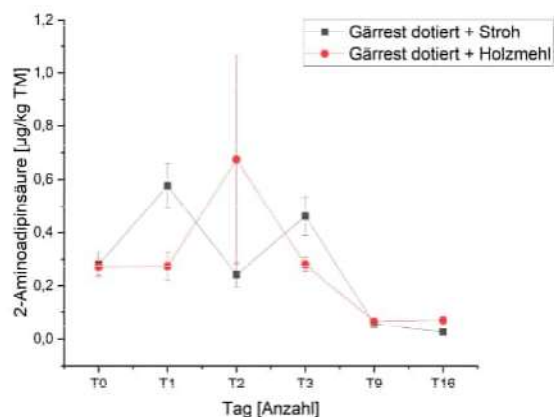


Abb. 4.4.1k: 6-Lactam-Metabolitgehalte unbepfl. Parzellen Abb. 4.4.1l: Desethylciprofloxacin-Gehalte

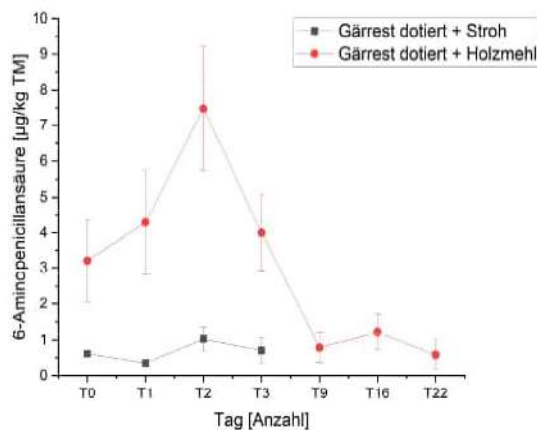


Abb. 4.4.1m: β -Lactam-Metabolitgehalte der Parzellen

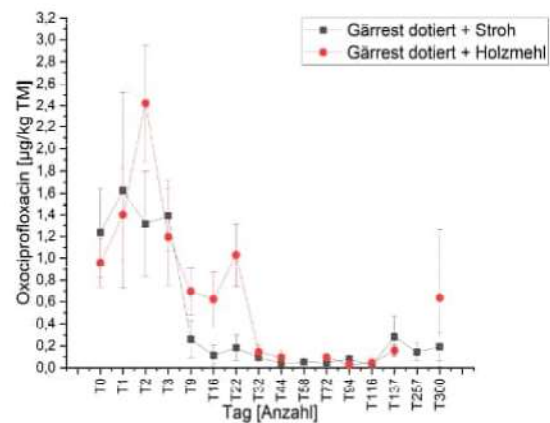


Abb. 4.4.1n: Oxociprofloxacin-Gehalte der Parzellen

Auffällig war, dass einzelne β -Lactam- Metaboliten insgesamt nicht oder bereits nach 2 – 3 Wochen nicht mehr nachweisbar waren. Die Fluorchinolone zeigten sich insgesamt stabiler als die β -Lactame bzw. ihre Metaboliten.

Parzellenversuche AGD Mais

Die Abbildungen 4.4.1(o-v) sowie im Anhang 2 veranschaulichen die Abbauprozesse der Antibiotika und ihrer Metaboliten auf Mais- Parzellen, die mit länger gelagertem, dotiertem Gärrest beaufschlagt waren. Es wurde dotierter Gärrest eingesetzt, der sich durch eine Lagerzeit (vor Ausbringung) von 10 Monaten gegenüber den anderen Parzellenversuchen unterschied.

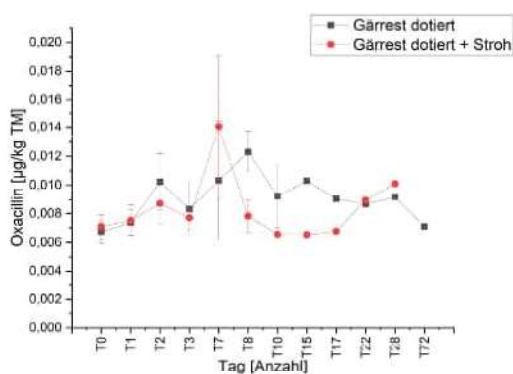


Abb. 4.4.1o: Oxacillin-Gehalte der Mais-Parzellen

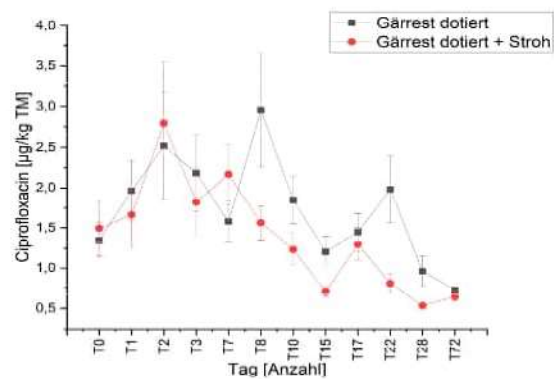


Abb. 4.4.1p: Ciprofloxacin-Gehalte der Mais-Parzellen

Es zeigte sich, dass lediglich das Oxacillin als typische β -Lactam- Originalsubstanz noch nachweisbar war, allerdings in äußerst geringen Konzentrationen. Die übrigen β -Lactam-Antibiotika waren innerhalb der Lagerungszeit offensichtlich vollständig metabolisiert.

Einige β -Lactam- Metaboliten wie Penicillamin, 2-Aminoadipinsäure und Phenoxyessigsäure waren nach wenigen Tagen ebenfalls vollständig abgebaut, wobei die Variante mit Stroh als Additiv die klareren Effekte zeigte.

Bei den Fluorchinolonen konnten zumindest die Originalsubstanzen Ciprofloxacin, Danofloxacin und Ofloxacin noch in auffälligen Konzentrationsbereichen über längere Zeiträume als die β -Lactame nachgewiesen werden. Dies trifft auch auf die Metaboliten Desethylen-, Oxo- und Formyl- Ciprofloxacin zu, die sich im Untersuchungszeitraum als relativ stabil erwiesen.

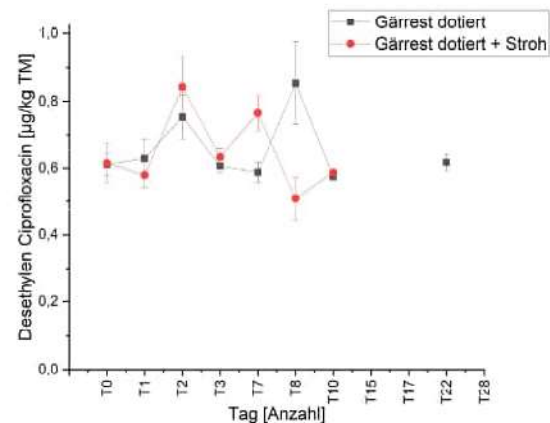
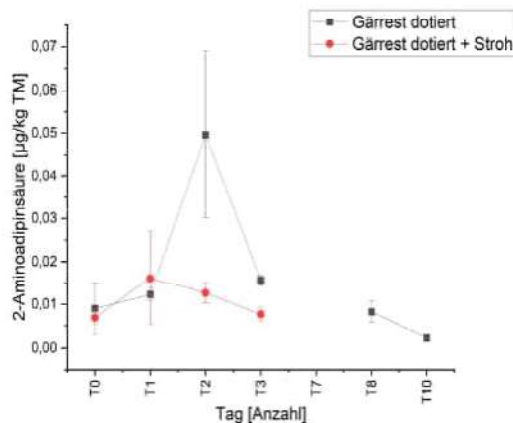


Abb. 4.4.1q: β -Lactam-Metabolitgehalte der Mais-Parzellen Abb. 4.4.1r: Desethylenciprofloxacin-Gehalte der Mais- Parzellen

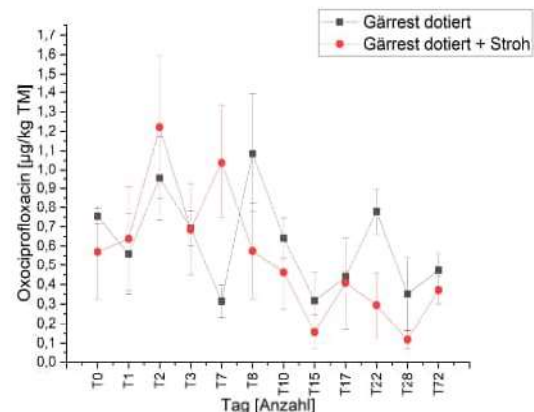
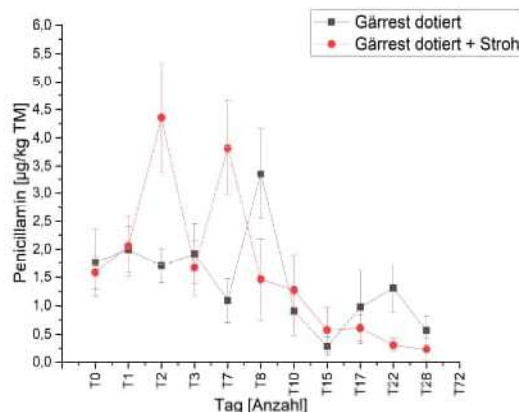


Abb. 4.4.1s: β -Lactam- Metabolitgehalte der Mais-Parzellen Abb. 4.4.1t: Oxociprofloxacin-Gehalte der Mais-Parzellen

Die längere Lagerungszeit des dotierten Gärrestsubstrats hat hinsichtlich der Metabolisierungsprozesse der Fluorchinolone auffällig geringen oder keinen Einfluss, wohingegen der Abbau der β -Lactame bereits eingeleitet und deutlich forciert worden ist. Der positive Einfluss von Stroh auf die biochemischen Umsetzungen der Substanzen zeigte sich insbesondere für Ciprofloxacin und den Metaboliten Oxociprofloxacin.

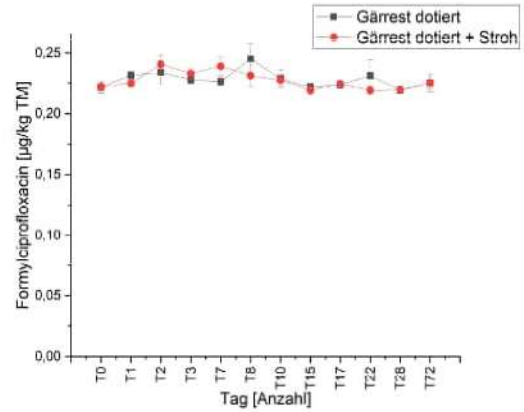
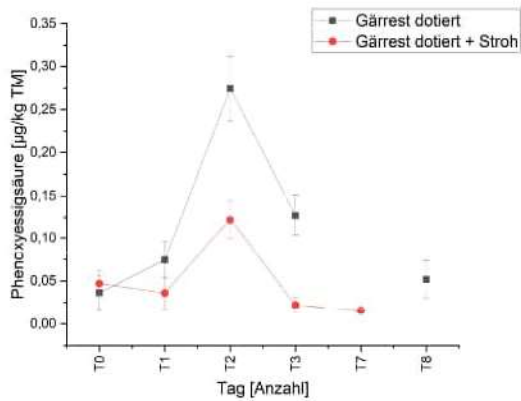
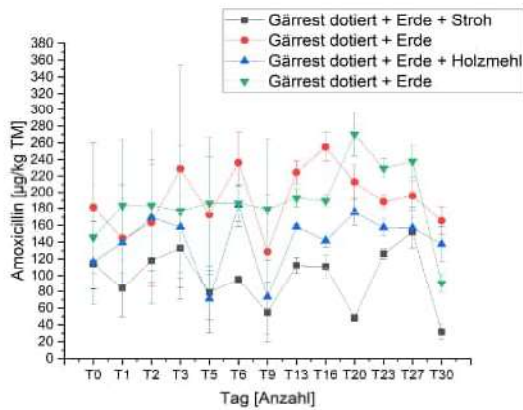


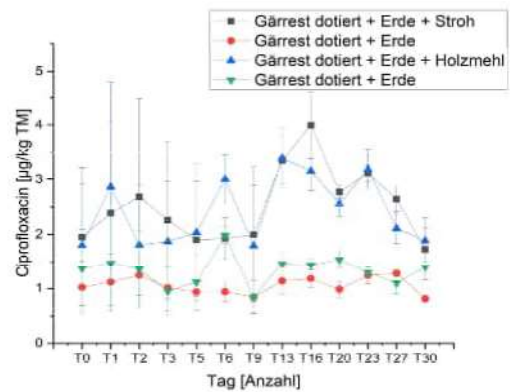
Abb. 4.4.1u: β -Lactam-Metabolitgehalte der Mais-Parzellen Abb. 4.4.1v: Formylciprofloxacin-Gehalte der Mais-Parzellen

4.4.2 Kompostierungs- und Vererdungsversuche

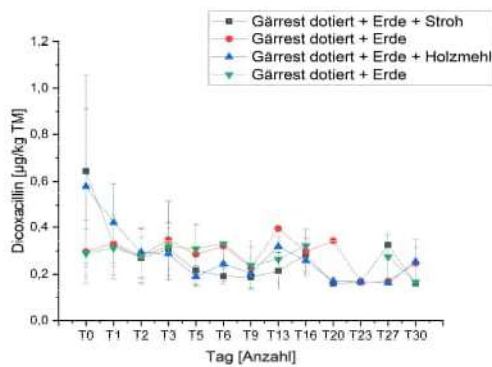
Die Abbildungen 4.4.2 (a-d) bzw. (e-i) und (j-m) veranschaulichen die Abbautendenzen der β -Lactame und Fluorchinolone in Kompostierungs- und Vererdungsversuchen über einen Zeitraum von 30 Tagen, der hinsichtlich der Metabolitenbildung besonders markant ist.



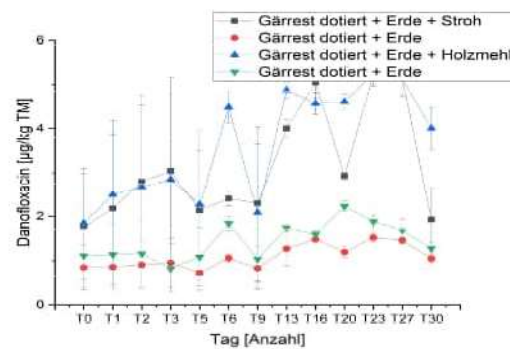
a)



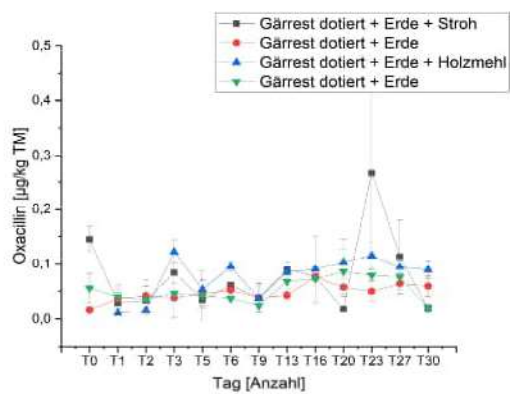
e)



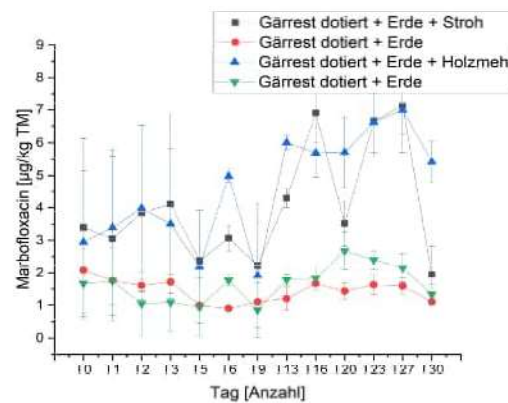
b)



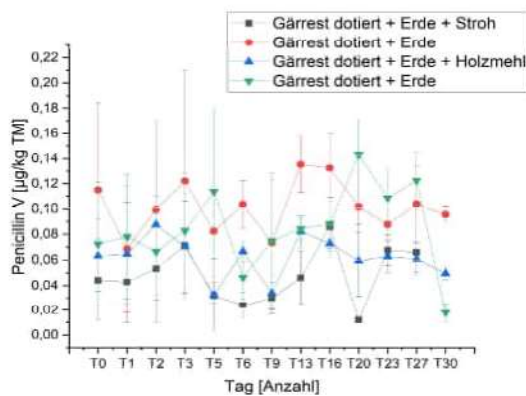
f)



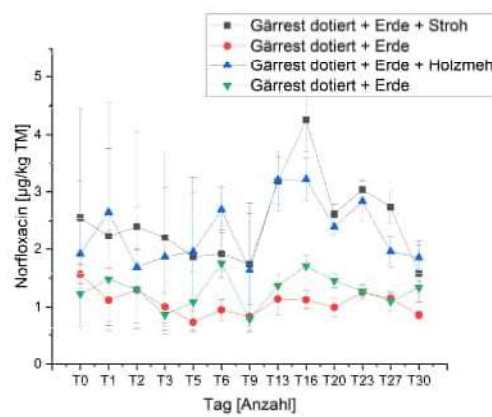
c)



g)

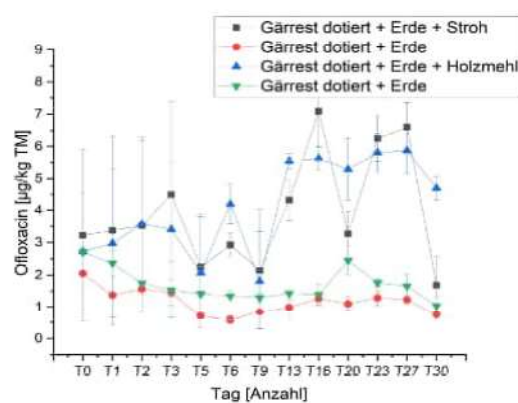


d)



h)

Abb. 4.4.2 (a-d): β -Lactam-Antibiotika



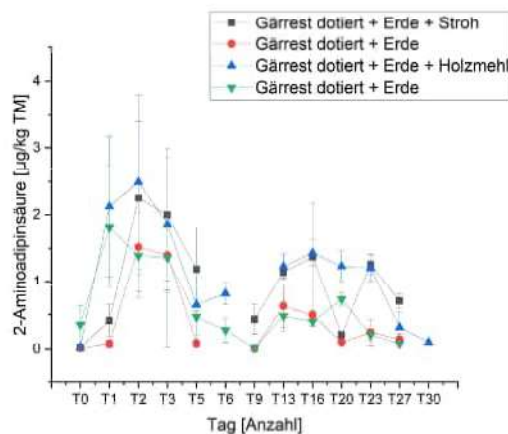
i)

Abb. 4.4.2 (e-i): Fluorchinolin-Antibiotika

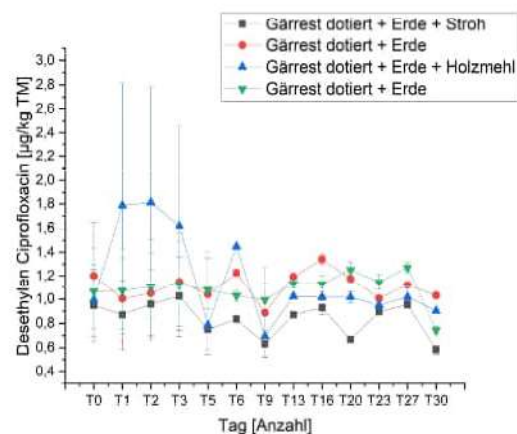
Für das Amoxicillin zeigten sich relative hohe stabile Konzentrationen über 30 Tage hinweg, wobei erst mit dem 30. Tag eine deutliche Abbautendenz sichtbar wurde, insbesondere bei der Variante mit Stroh. Das Dicloxacillin wurde im Messzeitraum systematisch reduziert. Bei Oxacillin und Penicillin V traten bereits zu Beginn bzw. während des Versuchsansatzes erhebliche Eliminationstendenzen auf und mit ca. 30 Tagen (Pen V) erfolgten weitere Reduzierungen. Beim Nor-, Marbofloxacin und Ofloxacin war nach 30 Tagen der Abbautrend sichtbar, insbesondere in den Varianten mit Erde (ohne Stroh oder Holzmehl).

Entsprechend kam es in den ersten Tagen zu auffälligen Anstiegen bei den β -Lactam-Metaboliten wie der 6-Aminopenicillansäure oder zeitverzögert bei der 2-Aminoadipinsäure, Phenoxyethylpenicillinsäure und Phenoxyessigsäure und zeitlich sukzessiver Elimination. Die Fluorchinolonmetaboliten zeigten ein ähnliches Verhalten, wobei die Varianten mit Stroh die auffälligsten Abbautendenzen aufwiesen.

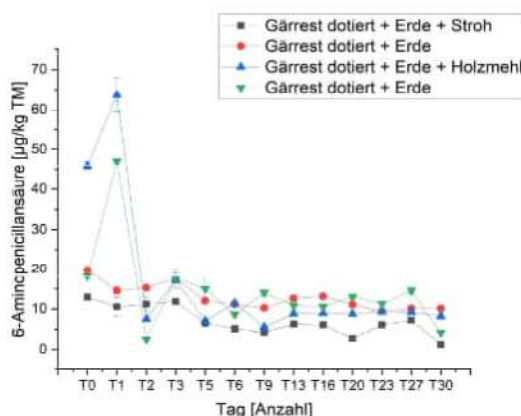
Metaboliten:



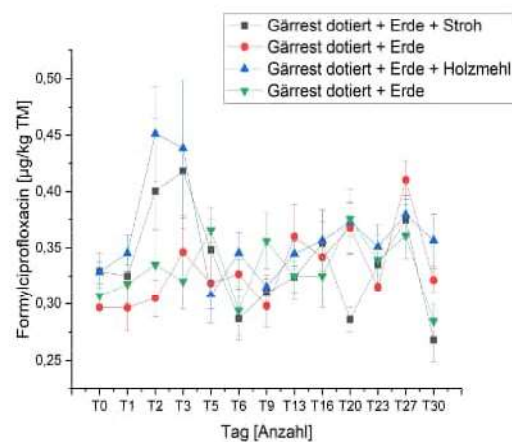
j)



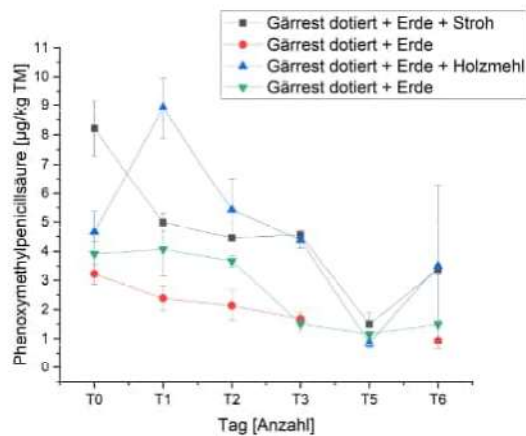
n)



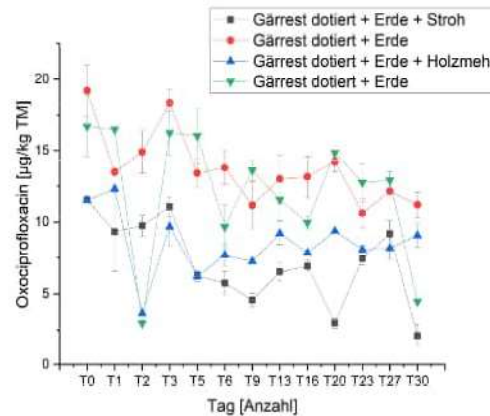
k)



o)

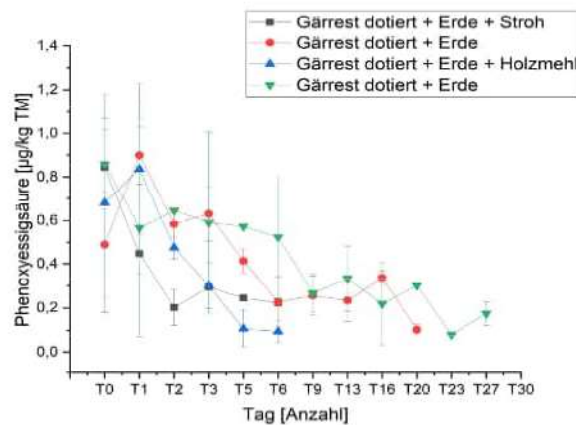


l)



p)

Abb. 4.4.2 (n-p): Metabolitengehalte der Fluor-chinolone



m)

Abb. 4.4.2 (j-m): Metabolitengehalte der β -Lactam- Antibiotika

4.4.3 Entwässerungsversuche

Die Versuche zur Entwässerung von Gärrest zeigten nach 8 Monaten bereits eine erhebliche Reduzierung der Volumina, wobei die entstehenden Sickerwassermengen insgesamt sehr gering ausfielen. Der Gärrest mit Zuschlägen zeigte auffallend mehr Sickerwasser als der Gärrest ohne Beimengungen (Abb. 4.4.3). Die Volumenreduzierung betrug im ersten Fall 70 %, im Behälter mit GR und Zuschlägen ca. 55 %. Die Verdunstung von Wasseranteilen ist dabei als wesentlicher Prozess zu sehen. Eine Fortsetzung ist im Rahmen von AGROPrax vorgesehen, da der Entwässerungs- und Vererdungsprozess noch nicht abgeschlossen ist.



Abbildung 4.4.3: Entwässerungsbehälter a) links, ohne Zuschläge und b) rechts, mit Zuschlägen

Weitere, insbesondere auch stoffliche Betrachtungen sollen ergänzend erfolgen. Ziel muss dabei auch sein, das austretende Sickerwasser auf ein absolutes Minimum zu reduzieren. Die besondere Herausforderung für künftige Untersuchungen liegt darin, die kleintechnischen Versuche zur Entwässerung in den Maßstab des Agrarbetriebes zu überführen, wobei Fragen der Kosteneffizienz und Praktikabilität im Vordergrund stehen müssen. Die Reduzierung des betriebseigenen Flüssigdüngers über Maßnahmen der Vererdung und Entwässerung könnten den Landwirten zusätzliche Ausbringoptionen im Rahmen der seit 2017 enger gefassten Düngemittelverordnung ermöglichen. Die dabei einhergehende qualitative Verbesserung des Substrates hin zu einem höherwertigen Feststoffdünger mit Nährstoffstabilisierung kann dabei einen wesentlichen Nebeneffekt des Verfahrens darstellen.

Ergänzung *Milchsäuregärung*

Versuche zur Milchsäuregärung erwiesen sich experimentell als sehr anspruchsvoll, werden im Bericht nicht näher ausgeführt und sollen im Projekt *AGROPrax* fortgesetzt werden. Im Projekt *Abiotec II* konnten wertvolle und grundlegende Erfahrungen bei der Durchführung gemacht werden. Aufgrund des relativ hohen Aufwands wird das praktische Interesse an diesem Verfahrensansatz wahrscheinlich nicht den akademischen Status verlassen.

4.5 Molekular- und mikrobiologische Arbeiten und Untersuchungen

4.5.1 Ansatz und Durchführung der qPCR

Basierend auf den berechneten DNA-Konzentrationen wurden PCR-Ansätze auf Basis eines interkalierenden Farbstoffes (Blue S'Green qPCR Kit, Biozym) mit den oben beschriebenen Primer-Sets (Eurofins Genomics, Deutschland) angesetzt. Die Realtime-PCR wurde durchgeführt mit dem einem AriaMX (Agilent) Gerät in der optischen Konfiguration FAM (Messwellenlänge) und ROX (interne Prozesskontrolle). Da in der aktuellen Konfiguration keine weiteren optischen Module vorliegen, konnte keine Multiplex-Methode etabliert werden. Somit musste für jedes Primer-Set ein separater Ansatz erstellt werden.

Die Annealing-Temperatur wurde auf einen mittleren Wert von 60 °C festgelegt, um alle Targets in einem Lauf abdecken zu können.

Tabelle 4.5.1 Thermalprofil

Thermalprofil			
Step	Zyklen	Temperatur	Zeit
Hot-Start	1	95	3:00 min
Denaturierung	40	95	0:05 min
Annealing	40	60	0:25 min
Elongation	40	72	0:20 min

Im Ergebnis konnte anhand der Schmelzkurven (vgl. Abb. 4.5.1 a/b) der qualitative Nachweis der gesuchten Targets erbracht werden. Damit ergibt sich die Grundlage für bioanalytische Methodik zur Untersuchung von Bodenproben hinsichtlich einer gezielten Identifikation beliebiger Targets. Die auf diese Weise bestimmten Schmelzkurven bilden somit die Voraussetzung für weitere Untersuchungen. Um eine quantitative Aussage abzuleiten, wird eine Referenz in Form einer externen Kalibrierung oder DNA-Standard mit definierten Konzentrationen benötigt. Dies bildet den Ausgangspunkt für weiterführende Methodenentwicklung und -optimierungen.

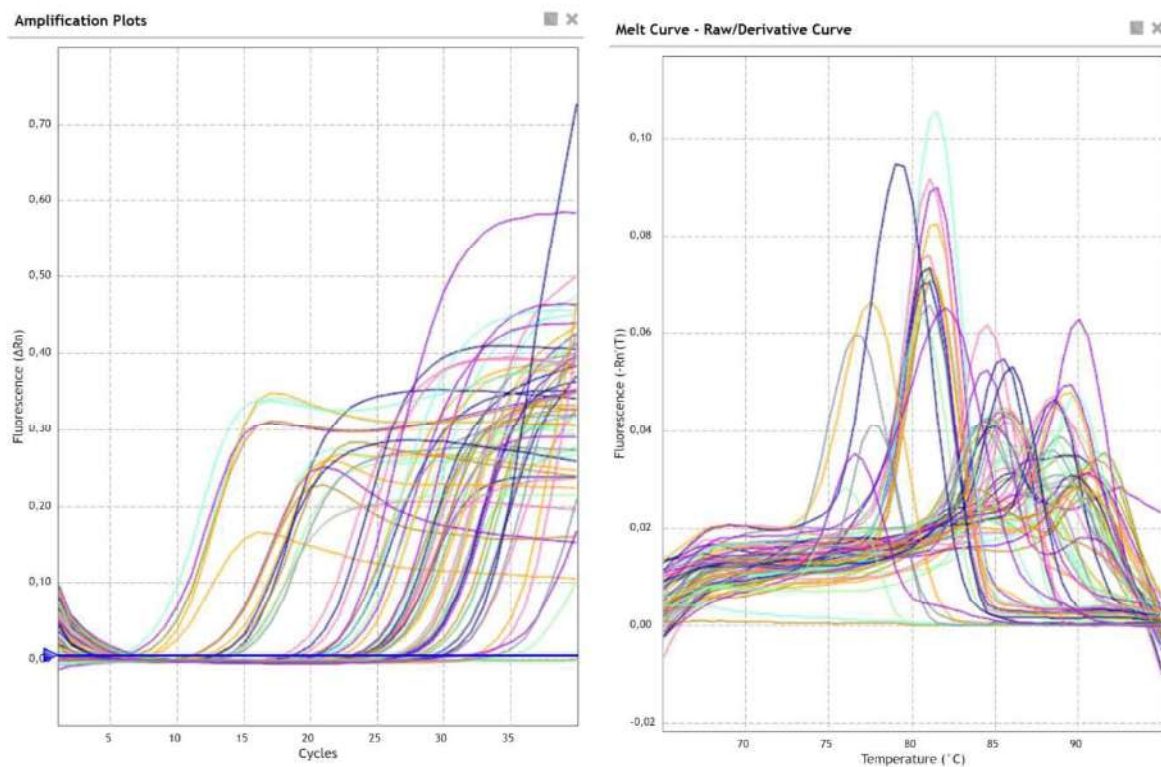


Abbildung 4.5.1a/b: Darstellung der Schmelzkurven der qPCR zur Identifizierung taxonomischer Marker und Antibiotika-Resistenzgenen

4.5.2 Mikrobiologische Untersuchungen

Die quantitativen Entwicklungen der Boden- Mikroflora in den **Parzellenversuchen** wurden in zeitlich aufeinanderfolgenden Proben in Böden auf den verschiedenen Parzellen untersucht. Standortsspezifisch war nur eine geringe Varianz zu erkennen. Die Daten wurden daher teils zusammengefasst dargestellt. Alle Keimzahlen wurden als Koloniebildende Einheiten pro Gramm [KbE/g] angegeben.

Bakteriologische Untersuchungen

In dem ausgebrachten Material waren Bakterien in Konzentrationen größer als in den Böden enthalten. Trotz des anteilig geringen Volumens war der initiale Beitrag zur Boden- Mikroflora quantitativ in allen Parzellen nachweisbar (vgl. Abb. 4.5.2- 1). Die Ausbringung der Gärreste mit und ohne Dotierung führte gleichermaßen zu einer temporär erhöhten Keimdichte gegenüber den Ausgangsböden.

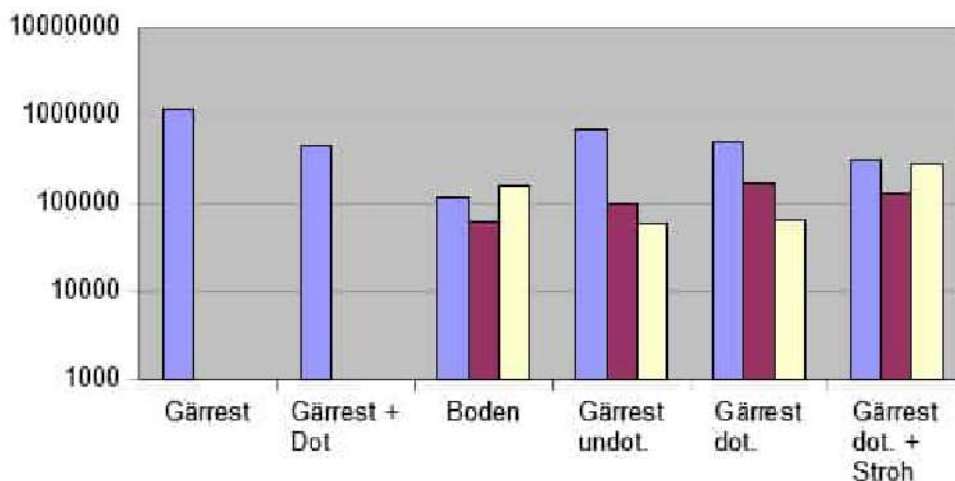


Abbildung 4.5.2 - 1: Aerobe bakterielle Gesamtkeimzahl [KbE/g] in Ausgangsmaterial und Böden im Verlauf eines Quartals

Die detektierten Werte wiesen jedoch im Verlauf der Beprobungen eine gleichartige Tendenz auf: Die Gesamtkeimzahlen fielen nach Zusatz von Antibiotika-dotiertem und undotiertem Gärrest etwa in den Bereich der Ausgangswerte zurück. Die Dotierung ergab hier keine Unterschiede.

Die Beimischung von Stroh führte zu einer höheren Gesamtkeimzahl. Die Vielfalt der vertretenen taxonomischen Gruppen blieb erhalten. Eine detaillierte Analyse wurde hier insgesamt nicht durchgeführt. Hygienerrelevante Arten (*Enterobacteriaceae*, Pseudomonaden, Streptokokken Enterokokken) waren in den Anfangsproben nur in sehr geringer Zahl vorhanden und wurden in der Folge nicht quantitativ nachgewiesen. Daher ließen sich für diese Gruppen keine Daten zu möglicherweise ausgebildeten Antibiotika-Resistenzen erheben.

Mykologische Untersuchungen

Die Zugabe von Gärresten hatte insgesamt eine leichte Abnahme der bakteriellen, nicht aber der Pilzflora zur Folge (vgl. Abb. 4.5.2- 2).

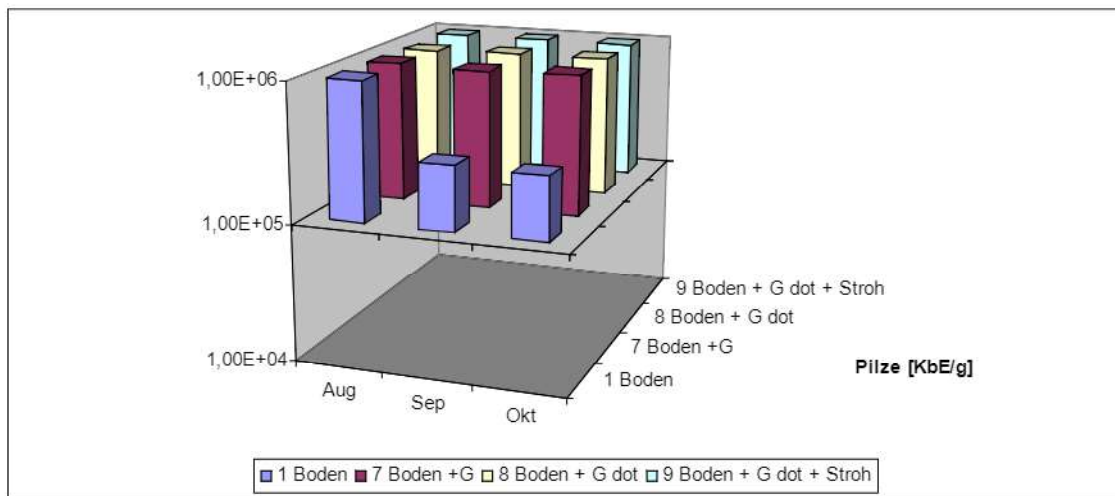
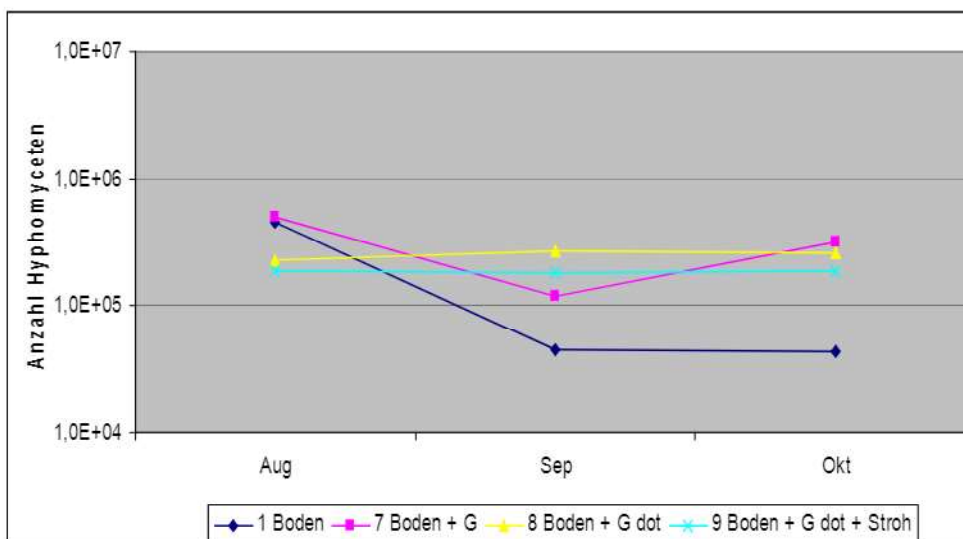
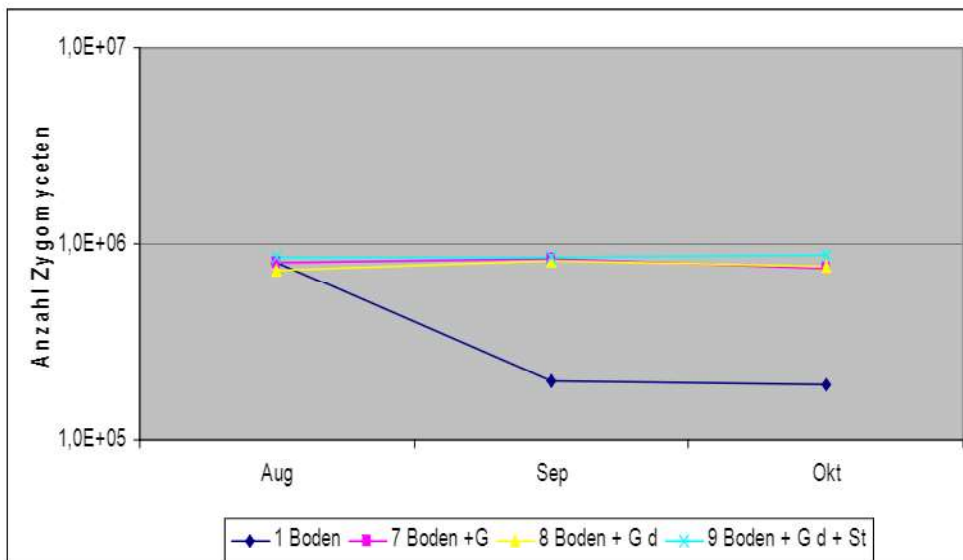
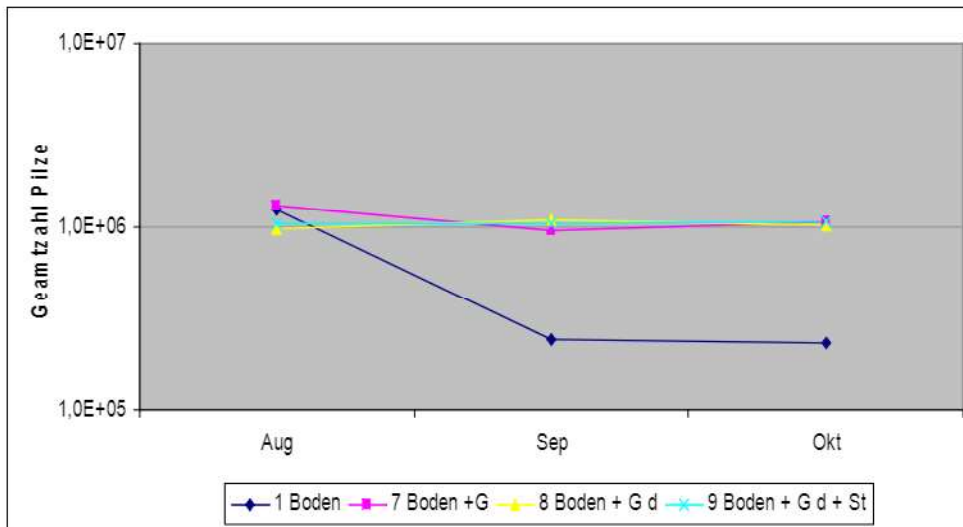


Abbildung 4.5.2 - 2: Gesamtzahl Pilze in Böden im Verlauf eines Quartals

Die Ausbringung von Gärrest mit einem Gehalt von Pilzen unter 10 % der im Boden vorgefundenen hatte keinen unmittelbaren Effekt auf die Ausgangskonzentration im Boden. Die Keimzahlen von Pilzen blieben konstant oder stiegen mit Zumischung von Stroh leicht an. In allen Proben war ein überwiegender Anteil von Zygomyceten, schnellwachsenden Arten der Gattungen *Mucor*, *Rhizopus* und *Absidia* zu verzeichnen. Deren Wachstumsverhalten bestimmte das Gesamtbild.

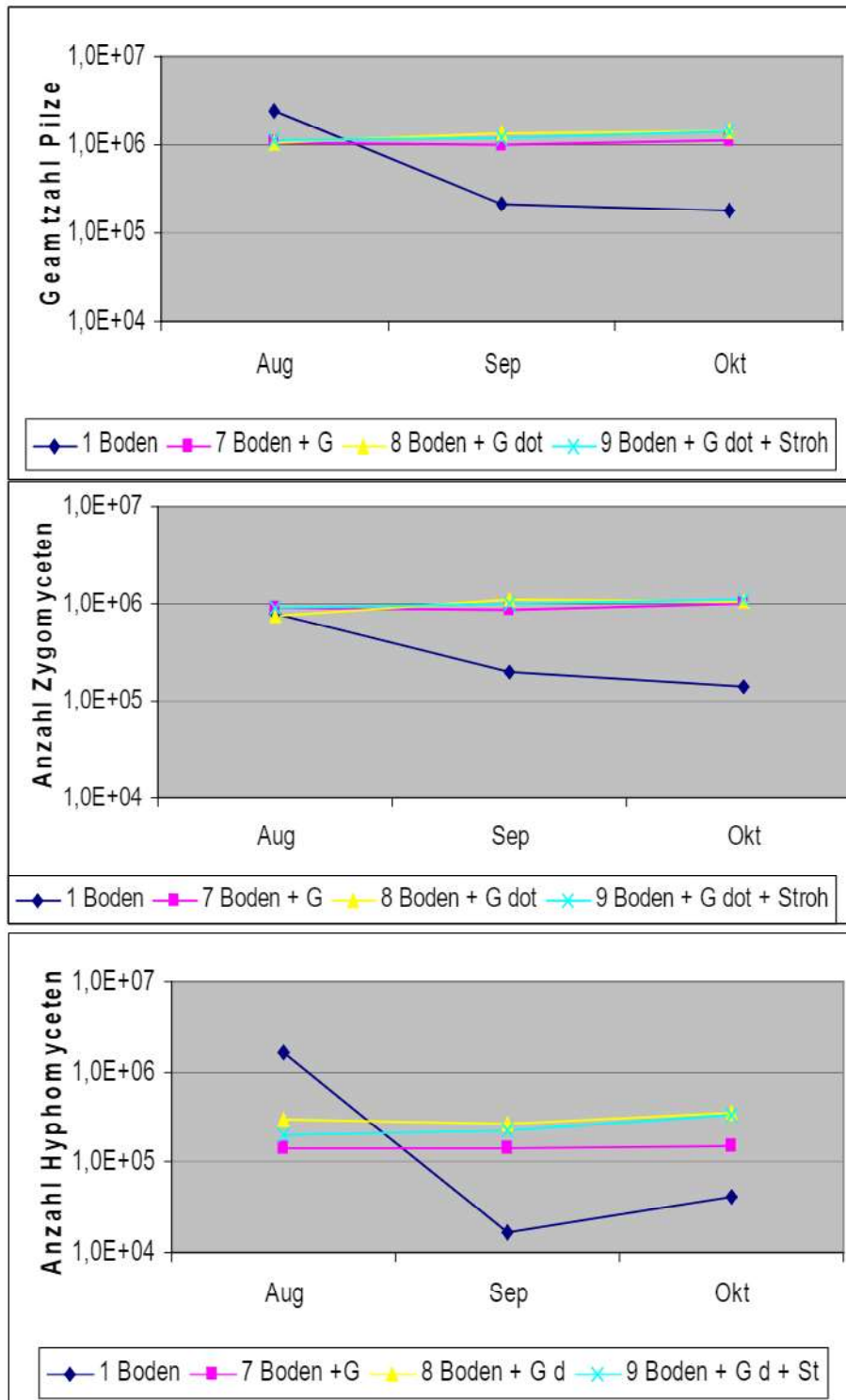
Auf verschiedenen Standorten mit unterschiedlichen Bewuchs zeigten sich Unterschiede. Die Zahlen der Zygomyceten waren relativ stabil. Die Hyphomyceten zeigten dagegen größere Veränderungen, sowohl Anstieg als auch Abnahme. Diese wirkten sich wegen der kleineren absoluten Werte in den Gesamtzahlen wenig aus. Aufgrund ihrer spezifischen physiologischen Eigenschaften können jedoch mehrere dieser Arten, insbesondere *Trichoderma* sp., das Wachstum sowohl von konkurrierenden Mikroorganismen aber auch von Pflanzen beeinflussen (Benítez et al., 2004). Phytopathogene Pilze wie *Fusarium* spp. wurden nicht nachgewiesen.

Auf den Parzellen der Agrargenossenschaft Diedorf ohne Kulturen sank die Keimzahl zum Herbst im unbeeinflussten Boden um ca. 80 %, während sie unter jeder Gabe von Gärrest nahezu konstant blieb (vgl. Abb. 4.5.2- 3, 4, 5).



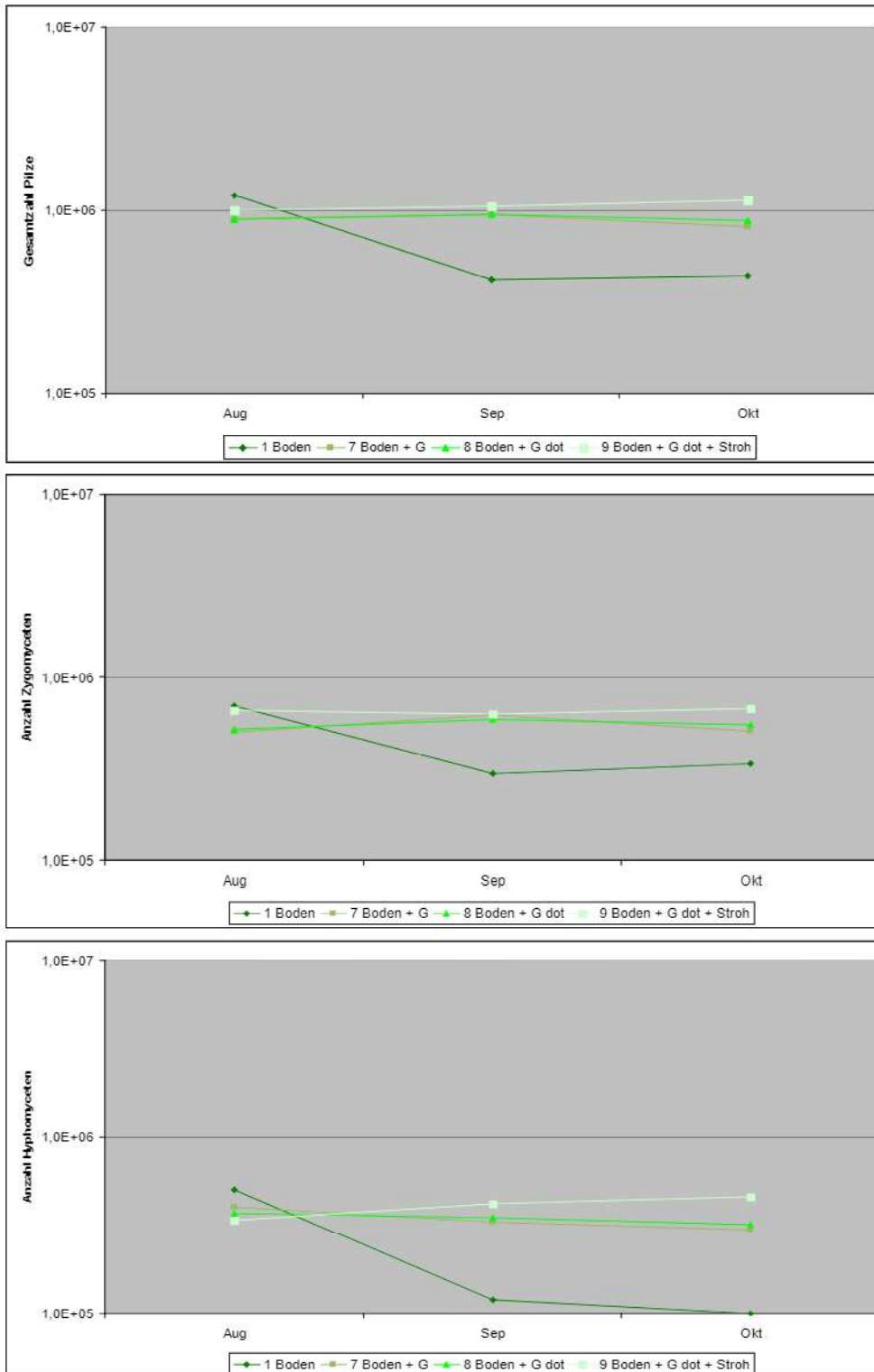
Abbildungen 4.5.2 - 3, 4, 5: Pilzzahlen Parzellen AGD/ohne Kultur:
Anzahl Pilze gesamt; Zygomyceten; Hyphomyceten

Auf den Parzellen der Agrargenossenschaft Diedorf mit Anbau von Mais sanken die Keimzahlen zum Herbst um ca. 90 %. Eine deutliche Abnahme der Hyphomyceten (Gattungen *Aspergillus*, *Paecilomyces* sowie sterile Mycelien) war auffällig, während die Zygomyceten weitgehend konstant blieben (vgl. Abb. 4.5.2- 6, 7, 8).



Abbildungen 4.5.2 - 6, 7, 8: Pilzzahlen Parzellen AGD/Mais:
Anzahl Pilze gesamt; Zygomyceten, Hyphomyceten

Auf der Parzelle des Agrarbetriebs Westhausen mit Anbau von Raps sank die Keimzahl zum Herbst um 60 %, woran beide Gruppen gleichermaßen Anteil hatten (vgl. Abb. 4.5.2- 9, 10, 11). Der Anstieg bei der mit Stroh versetzten Parzelle um 14 % geht vor allem auf ein Wachstum von Hyphomyceten (*Paecilomyces*, *Penicillium*, *Trichoderma*) zurück.



Abbildungen 4.5.2 - 9, 10, 11: Pilzzahlen Parzellen MPG/Raps: Anzahl Pilze gesamt; Zygomyceten, Hyphomyceten

In den kleintechnischen Ansätzen, in den **Kompostierungs- und Vererdungsversuchen** (auch sog. „Faßversuche“) wurden zeitlich engmaschigere Daten erhoben. Dabei konnten nahezu konstante Bedingungen von Temperatur, Materialfeuchte, Durchmischung und Luftzutritt erhalten werden.

Bakteriologische Untersuchungen

Für die bakterielle Gesamtkeimzahl wurden über eine Woche relativ konstante Werte gemessen. Danach war eine Verringerung um mehr als eine Größenordnung zu verzeichnen. Dieser Verlauf war sowohl für die aerobe Gesamtzahl als auch für die untersuchten hygienerelevanten Gruppen, welche in weit geringeren Zahlen nachweisbar waren, gleich. Es könnten dafür lokale Situationen, etwa nährstoffbedingt, in den Substraten verantwortlich sein.

Eine anfängliche Kontamination mit *Pseudomonas sp.*, die durch die Zugabe von Stroh entstanden war, erwies sich als nicht stabil. Die Art wurde nach 30 Tagen nicht mehr nachgewiesen.

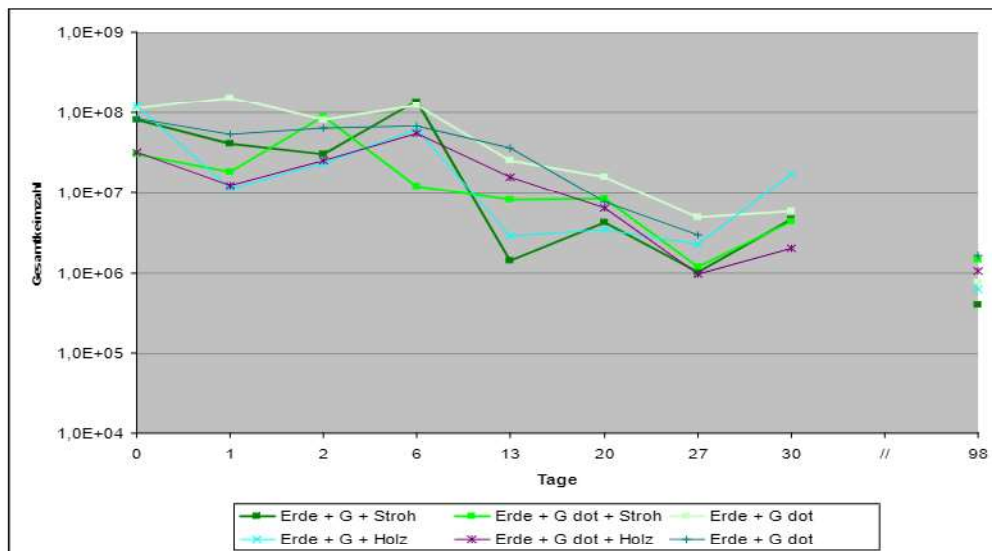


Abbildung 4.5.2 - 12: Gesamtkeimzahl in „Faßversuchen“ im Verlauf eines Quartals

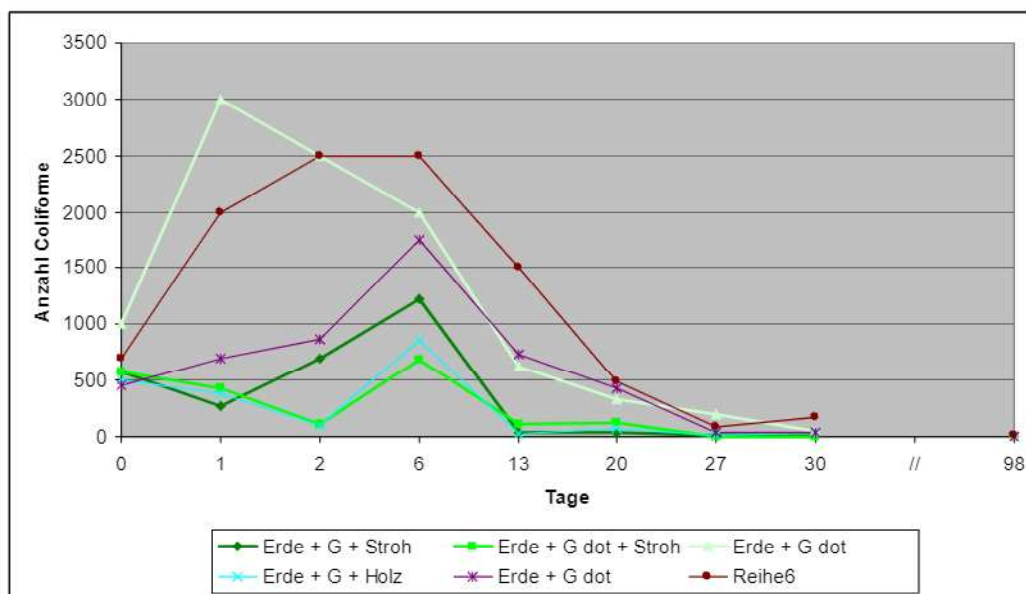


Abbildung 4.5.2 - 13: Coliforme Bakterien in „Faßversuchen“ im Verlauf eines Quartals

Jahreszeitliche Witterungs- und Temperatureinflüsse im beobachteten Zeitraum im Herbst führten zu einer stärkeren Abnahme der Konzentrationen der Mikroorganismen im Boden bei den Parzellen. Es konnten sowohl in den Parzellenversuchen wie in den „Faßversuchen“ keine spezifischen Unterschiede auf die Ausbringung der Antibiotika- Dotierung zurückgeführt werden.

Eine unmittelbare Wirksamkeit der Antibiotika war nicht nachweisbar. Deren Konzentration war möglicherweise geringer als die wirksame Dosis.

Mykologische Untersuchungen

Bei den Pilzen lagen die Zahlen um eine Größenordnung niedriger als bei den Bakterien. Dabei dominierten Zygomyceten (*Rhizopus*, *Mucor*) mit einem Anteil von 78 %. Es war teilweise eine nahezu konstante Konzentration zu verzeichnen. Die Proben wiesen analog den bakteriellen Zahlen einen Abfall von 40 bis 60 % nach der ersten Woche auf.

Der zwar kleinere Anteil der Hyphomyceten blieb dabei auf gleichem Niveau, zeigte aber kurzfristige Schwankungen.

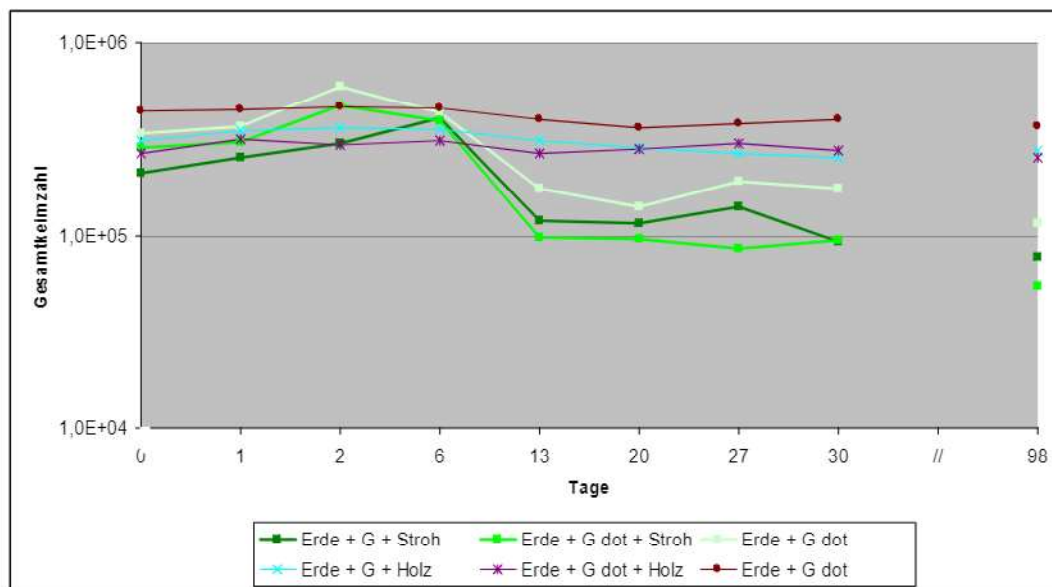


Abbildung 4.5.2 - 14: Gesamtkeimzahlen der Pilze in „Faßversuchen“

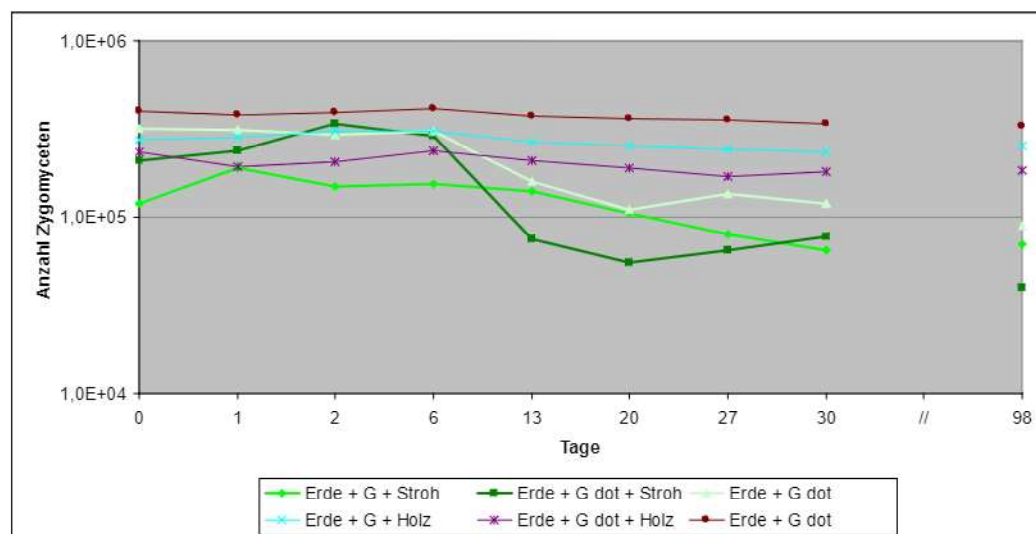


Abbildung 4.5.2 - 15: Keimzahlen der Zygomyceten in „Faßversuchen“

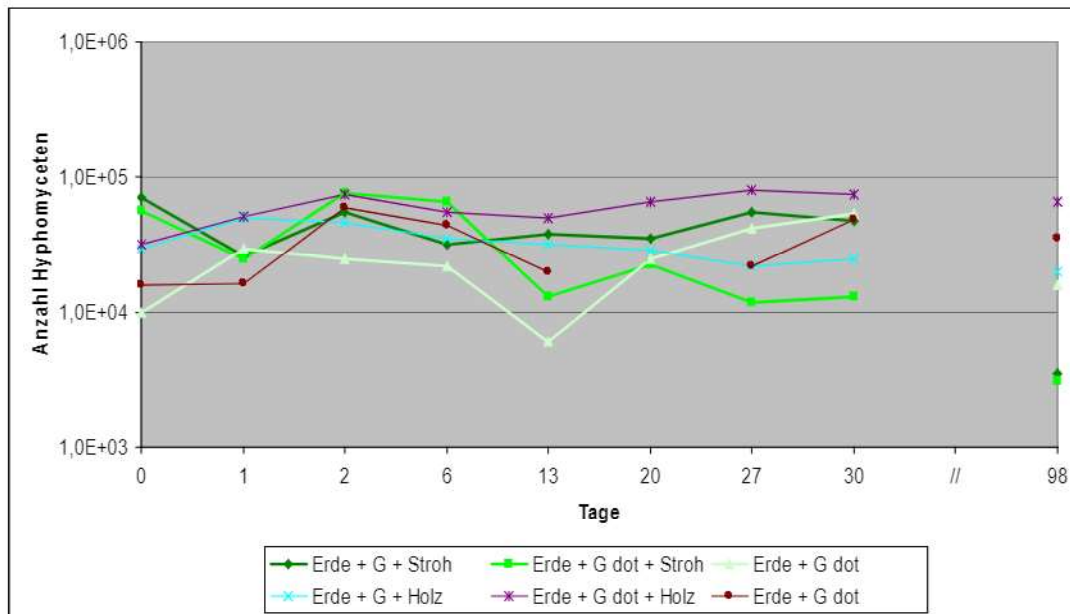


Abbildung 4.5.2 - 16: Keimzahlen der Hyphomyceten in „Faßversuchen“

Die in allen Versuchen beobachtete anfängliche Verminderung der Keimzahlen lässt sich nicht konsistent erklären. Sowohl die möglicherweise ungünstigen Bedingungen der Witterung im Freien wie auch die gleichbleibenden im Labor führten offenbar zu ähnlichen Effekten.

In allen Versuchsreihen war die Zumischung von Pflanzenmaterial (Stroh) mit einer Erhöhung der Organismenzahl verbunden. Diese Förderung konnte insbesondere bei den Pilzen keiner einzelnen Gruppe oder Gattung zugeordnet werden.

Dabei kann die Bereitstellung von Mikrohabitaten ebenso wie die kontinuierliche Versorgung mit Nährstoffen aus den Abbauprozessen der stabileren pflanzlichen Makromoleküle (Zellulose) von Bedeutung sein.

Bei sämtlichen betrachteten, hygienerelevanten Gruppen konnten keine Antibiotika-resistenten Kolonien nachgewiesen werden. In den Parzellenversuchen waren die Zahlen dieser Bakterien sehr gering. Die Problematik der Resistenzförderung kann daher vor allem in der Möglichkeit des Gentransfers über Arten der autochthonen Bodenflora gesehen werden. Die Identifizierung von entsprechenden Genen mit molekularbiologischen Verfahren sollte dazu zukünftig weitere Ergebnisse bringen.

4.6 Wirtschaftlichkeitsbewertung für die Anwendung von Maßnahmen im Agrarbetrieb

Der Erhalt der Bodenfruchtbarkeit und –gesundheit und eine nachhaltige Ressourceneffizienz sind Basis und wirtschaftliche Grundlage eines jeden modernen Agrarbetriebes. Die wirtschaftseigenen Dünger spielen dabei im Rahmen einer betriebsangepassten Nutzung im Sinne einer Kreislaufwirtschaft eine wesentliche Rolle. Insbesondere vor dem Hintergrund der massiv gestiegenen Düngemittelpreise in 2022 ist dies in der Branche noch einmal deutlicher geworden. In den Gebieten mit hoher Tierhaltungskonzentration (Nordwestdeutschland, Südbayern) war vor 2022 ein wesentlicher Fokus der Diskussion die „Entsorgung“ von Gülle und Gärresten gewesen, um Nährstoffexporte zu realisieren. Die Einführung der sogenannten „roten Gebiete“, in denen eine Reduktion der Nährstoffeinträge vorgenommen werden muss haben diese Diskussion noch weiter verschärft. In 2022 hingegen stieg die Nachfrage nach Gülle, Mist und Gärresten als organische Düngemittel hingegen deutlich an, so dass die Transportkosten für Gülle und Gärreste keine Hürde mehr darstellten und der „Entsorgungsdruck“ in diesen Regionen deutlich abgenommen hat. Allerdings ist dies auch als eine besondere Situation anzusehen, die auf eine fehlgerichtete Agrarförderung der letzten Jahrzehnte zurückzuführen ist, die erst zu der zu hohen Tierhaltungskonzentration geführt hat.

Ausgehend von diesen Regionen ist aber der Einsatz von Technologien zur Behandlung von Gülle nicht ganz unüblich. Beispielsweise ist die Fest-Flüssig-Separation von Rohgülle als auch von Gärresten in Pressschneckenseparatoren regelmäßig zu finden, um ein transportwürdiges organisches Düngemittel mit hohem Trockensubstanzgehalt zu erzielen. Die Behandlungskosten sind dafür aber mit 1 – 1,50 €/m³ überschaubar.

Deutlich höhere Investitionen und daraus resultierende Behandlungskosten für die Stoffströme sind mit der energetischen Nutzung von Mist und Gülle verbunden. Die Kosten lassen sich nicht einfach auf die Menge der Einsatzstoffe zurückrechnen, da die Investitionen durch Anreize aus der energetischen Nutzung motiviert werden und die Kosten darüber auch vollständig kompensiert werden. Im Wesentlichen wirken die folgenden Anreize:

- Vergütung für die Stromerzeugung aus Biogas durch das Erneuerbare-Energien-Gesetz; hier gibt es aber keine spezifischen Anreize für die Stromerzeugung aus Gülle und Mist, abgesehen von einer Ausnahme von Biogasanlagen, die mindestens zu 80% Mist und Gülle vergären und eine leicht erhöhte Vergütung erhalten.
- Verpflichtung zum Einsatz von Mindestanteilen erneuerbarer Wärme in Gebäuden nach dem Gebäude-Energie-Gesetz – hier besteht kein direkter monetärer Anreiz, aber eine Verpflichtung, die zum Vergleich der verschiedenen möglichen Energieträger untereinander führt und für Biogas als Energieträger bei lokaler Verfügbarkeit regelmäßig wirtschaftlich vorteilhaft ist. Es gibt auch hier keine spezifischen Anreize für den Einsatz von Biogas aus Gülle und Mist.
- Großes freiwilliges Interesse von Unternehmen und Privatpersonen am Einsatz erneuerbarer Energie mit geringem CO₂-Fußabdruck, dass mit einer erhöhten Zahlungsbereitschaft gegenüber fossilen Energieträgern verbunden ist. Es gibt auch hier keine spezifischen Anreize für den Einsatz von Biogas aus Gülle und Mist.
- Eine besonders große Zahlungsbereitschaft gibt es für Biomethan aus Gülle und Mist, das als Fahrzeugkraftstoff verwendet wird, da die Verpflichtung der Inverkehrbringer von Kraftstoffen zur Treibhausgasminderung gerade durch Kraftstoffe mit besonders geringem CO₂-Fußabdruck erfüllt werden kann und damit besonders hohe Preise gezahlt werden.

Um Gülle und Mist in die energetische Nutzung zu bringen, erfolgt heute vielfach eine Umlagerung und der Transport von Gülle und Mist. Transportentfernungen betragen dabei meist < 20 km, resultierende Transport- und Handlingkosten liegen je nach Transportentfernung ca. 3 – 10 €/t Mist bzw. Gülle. Da diese Kosten aber durch die Erlöse aus der energetischen Nutzung (siehe Aufzählung oben) kompensiert werden, müssen sie nicht der Tierhaltung angelastet werden.

Anders verhält es sich mit Maßnahmen, die allein der Reduktion von antibiotischen Stoffen und ihren Metaboliten im Stoffkreislauf dienen, auch wenn sich dadurch erhebliche Vorteile ergeben. Solche Maßnahmen müssen letztlich vollständig der Tierhaltung angelastet werden, hinsichtlich des Verursacherprinzips wird dies auch als korrekt angesehen. Das Forschungsprojekt hatte nicht zum Ziel, ein ausgereiftes technologisches Verfahren zu entwickeln, wohl aber technologische klare Ansätze zur Reduktion von antibiotischen Stoffen und ihren Metaboliten im Stoffkreislauf.

Ausgehend von den Analysen zum Abbau von Antibiotika unter verschiedenen, für die Praxis geeigneten Bedingungen hat sich herauskristallisiert, dass insbesondere aerobe Behandlungsverfahren zu einer Reduktion führen. Dies bestätigt die Erkenntnisse aus dem Projekt *Abiotec I*.

Zusätzlich gibt es – ausgehend von bisher unveröffentlichten Forschungsarbeiten an der Universität Linköping in Schweden – klare Indizien dafür, dass eine Ammoniumstrippung von Fermenterhalten in Biogasanlagen zu einer Reduktion der Antibiotikaresistenz-Genen in den Mikroorganismen führt. In dem Prozess werden Fermenterhalte bei hohen pH-Werten von 8-9 für eine Stunde auf 70°C erhitzt. Dies ist klar mit Mehrkosten verbunden. Besonders vorteilhaft ist aber, dass der Biogasertrag aus dem behandelten Material in einer nachgelagerten Gärstufe durch die Behandlung ansteigt und so zur Amortisation der Mehrkosten beiträgt. Darüber hinaus spielt die Ammoniumstrippung eine zunehmende Rolle in der Biogastechnologie, da bei hohen Anteilen tierischer Exkremente an der Substratmischung, insbesondere bei Einsatz von Geflügelkot, die Ammoniumkonzentrationen für den Biogasprozess toxisch werden und ein biologisch stabiler Prozess nur durch Senkung der Ammoniumkonzentrationen erreicht werden kann.

Vor dem Hintergrund der oben diskutierten technologischen Optionen und den im Vorhaben gesammelten Erfahrungen werden nachfolgend drei mögliche Behandlungsverfahren einer wirtschaftlichen Analyse unterzogen:

- Gezielte aerobe Stabilisierung in einer passiven Mietenkompostierung (entsprechend der detaillierten Prozessbeschreibung im Vorhaben *Abiotec I*)
- direkte Ausbringung und Einarbeitung des Wirtschaftsdüngers in den Oberboden (um einen aeroben Abbau zu ermöglichen, hierauf wurde in den Parzellenversuchen im Vorhaben fokussiert)
- Verwendung der oben beschriebenen Ammoniumstrippung

Die betriebswirtschaftlichen Auswirkungen der verschiedenen Optionen werden nachfolgend diskutiert.

Für die **gezielte aerobe Stabilisierung** wird in den nachfolgenden *Tabellen 4.6 -1* und *4.6 -2* für verschiedene Exkrementarten eine sehr grobe Wirtschaftlichkeitsberechnung durchgeführt, die aus dem Projekt ABIOTEC I abgeleitet und aktualisiert wurde.

Tabelle 4.6 - 1: Technische Charakterisierung der Behandlung von Exkrementen am Beispiel einheitlicher Menge von 100 t

Exkrementart	Einheit	Rinderfestmist	Rindergülle	Schweinegülle
Trockensubstanzgehalt	% der Frischsubstanz	25	8	4
Behandlungsmenge	t	100	100	100
Strohbedarf zur Erreichung von 25 % Trockensubstanz	t	0	294	727
Gesamtmenge zur Behandlung	t	100	394	827
Mietenlänge	m	286	1126	2363
Fläche zur Behandlung	m ²	403	1588	3331
Radladernutzung Mischen und Aufsetzen	h	14	56	118
Radladernutzung Miete Mischen	h	5	19	39
Radladernutzung Mietenabbau	h	2	9	20
Wassermenge	m ³	14	56	118
Restmenge nach 5,5 Monaten	t	85	242	462
Annahmen:				
Schüttdichte 350 kg/m ³ ; Mietenquerschnitt: 1 m ² bei 1 m Höhe Dreiecksmiete; Grundfläche: 1,41 m ² /m Länge; Substratmischung und Mietenaufbau 3 min pro Meter mit Radlader; Stroh: 90 % TS				
Mietendurchmischung 1 min pro Meter mit Radlader; Mietenabbau 0,5 min pro Meter mit Radlader; Abtransport und Ausbringung: nur für Strohanteil (Exkremente würden sowieso ausgebracht)				
Strohmenge wird durch biologischen Abbau um 50 % reduziert; Exkrementemenge bei Festmist um 15 %; bei Rindergülle um 5%; bei Schweinegülle um 1%; Gesamtbefeuchtung: 50 Liter pro Meter Miete				

Tabelle 4.6 - 2: Ökonomische Auswertung der Behandlung von Exkrementen am Beispiel einer einheitlichen Menge von 100 t

Exkrementart	Einheit	Rinderfestmist	Rindergülle	Schweinegülle
Strohbereitstellung (80 €/t)	€	0	23.538	58.154
Fläche, befestigt (10.000 €/ha/a)	€	201	794	1.666
Radladernutzung mit Fahrer (130 €/h)	€	2.786	10.982	23.036
Brunnenwasser (2 €/m ³)	€	29	113	236
Ausbringungskosten Strohanteil (5 €/t)	€	0	736	1.817
Gesamtkosten 100 t Exkremente	€	3.016	36.163	84.909
spezifische Gesamtkosten	€/t	30	362	849

Für die **direkte Ausbringung und Einarbeitung des Wirtschaftsdüngers in den Oberboden** sind direkte Kosten grundsätzlich nicht anzusetzen. Dies resultiert aus dem Fakt, dass Wirtschaftsdünger sowieso unter Berücksichtigung der Düngegesetzgebung als organischer Dünger auf Agrarflächen ausgebracht werden. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass die Wirtschaftsdünger bei direkter Ausbringung nicht mehr für eine energetische Nutzung und die daraus erzielbaren Erlöse bereitstehen. Daher wird – ausgehend von aktuell gezahlten Marktpreisen – davon ausgegangen, dass ein entgangener Erlös als „Behandlungskosten“ angesetzt werden kann. Damit resultieren für Schweinegülle (aufgrund des geringen Energiegehaltes) 0 €/t, für Rindergülle ca. 5 €/t, für Rinder- und Schweinefestmist ca. 35 €/t und für Geflügelmist ca. 60 €/t.

Die **Ammoniumstrippung** ist nur sinnvoll im Kontext einer energetischen Nutzung von Exkrementen umzusetzen (vgl. *Tab. 4.6 -3*). In Anlagen, die aus prozessbiologischen Gründen eine Ammoniumstrippung integrieren müssen, wird davon ausgegangen, dass für die Reduktion der Antibiotikaresistenz keine zusätzlichen Kosten anzusetzen sind. Sofern die Ammoniumstrippung aber durchgeführt wird, um die Antibiotikaresistenz zu mindern sind die in der folgenden Tabelle angenommenen Kenndaten relevant.

Tabelle 4.6 -3: Ökonomische Bewertung der Ammoniumstrippung von Exkrementen am Beispiel einer einheitlichen Menge von 100 t Festmist

	Einheit	Kennwerte für 100 t Exkreme
Wärmebedarf	kWhth	67
Strombedarf	kWhel	110
Schwefelsäurebedarf	m ³	20
Produktion Ammoniumsulfat	m ³	60
Mehrertrag an Biogas (5%)	€	5.772
Investition (240 t/d)	€	640.000
Wartungskosten (240 t/d)	€	22.400
spezifische Gesamtkosten	€/t	12

Ausgehend von der obenstehenden Auswertung wird deutlich, dass die Kosten der Behandlung stark von den Rahmenbedingungen vor Ort abhängen. Sofern keine energetische Nutzung von Gülle und Mist erfolgt ist ganz klar die klassische direkte Ausbringung und Einarbeitung des Wirtschaftsdüngers in den Oberboden die ökonomisch sinnvollste Art und Weise, die Exkreme sinnvoll zu nutzen und gleichzeitig die Konzentration von Antibiotika und Metaboliten zu senken. Sofern eine energetische Nutzung in der Biogasanlage erfolgt sollte eine Ammoniumstrippung auch bei geringen Ammoniumkonzentrationen in Erwägung gezogen werden. Allerdings muss die Wirkungsweise und Effektivität dieses Verfahrens noch evaluiert und wissenschaftlich untermauert werden.

Trotzdem ist zu berücksichtigen, dass selbst die einfachste technische Maßnahme zur Behandlung von Exkrementen zur Reduktion von Antibiotika vor der Ausbringung als Dünger zu hohen spezifischen Kosten führt. Bei der direkten Behandlung von Rinderfestmist bedeutet dies bei einer typischen Festmistmenge von 11,29 dt/Monat¹ für eine 8.000-Liter-Milchkuh Behandlungskosten von 401 € pro Kuh bzw. 5 ct/Liter Milch. Hinsichtlich der Behandlung von Rindergülle vervielfachen sich diese Kosten etwa um den Faktor 10.

Diese Analyse zeigt sehr deutlich, dass vor der Festlegung selbst einfachster Maßnahmen eine extrem hohe Sicherheit bestehen muss, dass die Maßnahme eine wissenschaftlich erwiesene Reduzierung der Antibiotikaabfuhr bewirkt.

Die Analyse zeigt aber noch vielmehr, dass Mehrkosten, die durch den Verzicht auf Antibiotika, z.B. durch geringere Milch- oder Fleischleistung entstehen, mit großer Sicherheit vorteilhaft gegenüber nachgelagerten Maßnahmen zur Behandlung von Exkrementen sind.

Bei einer direkten Ausbringung und Einarbeitung des Wirtschaftsdüngers in den Oberboden, einer einfachen Miststapelung (ohne weiteres Umsetzen) oder aber direktem Tretmist reduzieren sich die Kosten auf nahe Null.

¹ <http://www.landwirtschaftskammern.de/pdf/guelledaten-rinder.pdf>

4.7 Internationaler Workshop

Der Einsatz spezialisierter Pharmaka ist zu einem wichtigen Bestandteil der heutigen Tierhaltung geworden, die ihrerseits wiederum versucht, den Ansprüchen der Konsumenten gerecht zu werden. Am 17. und 18. April (2023) fand an der Materialforschungs- und –prüfanstalt Weimar ein Internationaler Workshop „Antibiotics in Manure and Digestate“ (Antibiotika in Gülle und Gärrest) statt. Ziel des Workshops war es, einerseits Messmethoden und Herausforderungen beim Einsatz von Veterinärantibiotika zu erörtern und Strategien zum Umgang mit der Problematik ihres Einsatzes zu reflektieren. Thematisiert wurden die Wirkung von Antibiotika auf den Boden, die Veränderung des Bodenmikrobioms und Probleme im Zusammenhang mit dem Auftreten von Antibiotikaresistenzen, aber auch Auswirkungen ausgewählter Behandlungsmöglichkeiten sowie Ansätze im Rahmen einer fruchtbaren Kommunikation zwischen Behörden, Landwirten und Tierärzten. Die Veranstaltung fand in Kooperation mit dem Institut für Biogas, Kreislaufwirtschaft und Energie, Weimar, statt. Mit knapp 50 Teilnehmern vor Ort oder online zugeschaltet waren Fachleute und Forscher aus den USA, Deutschland, Niederlande, Dänemark, Schweden, Schweiz, Österreich, Spanien, Tschechien und China beteiligt.

Erkenntnisse:

Die Festlegung von Reduktionszielen und die Risikobewertung sind kompliziert und hängen vom Kontext ab.

Carl Telle (M.Sc.), wissenschaftlicher Mitarbeiter in den Forschungsprojekten Abiotec I und II, eröffnete den fachlichen Austausch mit einem Vortrag zu den Inhalten und Ergebnissen der beiden anwendungsorientierten Forschungsvorhaben der MFPA Weimar. Neben methodischen Entwicklungen und spezialisierter Analytik, stellte er die erprobten Verfahrensansätze vor und bot damit Einstieg und Grundlage für die anstehende Diskussion zur Erarbeitung einer Handreichung mit praktikablen Maßnahmen zur Reduktion des Eintrags von Veterinärpharmaka in die landwirtschaftlich genutzte Umwelt.

Lisa Durso (Ph.D.), eine Forschungsmikrobiologin vom USDA Agricultural Research Service, erörterte die sehr grundlegenden Fragen der Risikobewertung und der möglichen Bestimmung eines Antibiotikaresistenzniveaus, das als Basiswert angesehen werden könnte. Sie weist darauf hin, dass mehrere Strategien zur Eindämmung von Antibiotikaresistenzen sehr vielversprechend waren, etwa Kompostierung, anaerobe Vergärung, thermische Verarbeitung und sogar die Ausbringung auf dem Land – mit einigen Ausnahmen. Die Ergebnisse anderer Forscher des Workshops untersuchten genauer, welche Substanzen durch die Behandlung möglicherweise eliminiert werden und welche nicht.

Carlton Poindexter (Ph.D.) präsentierte Forschungsergebnisse aus seiner Dissertation über die Auswirkungen ausgewählter Güllemanagementpraktiken auf Antibiotikarückstände, antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotikaresistenzgene für ausgewählte Antibiotika. Seine Ergebnisse zeigten, dass sie unter denselben Bedingungen nicht das gleiche Verhalten zeigten.

Das Schicksal von Antibiotika im Boden und die Rolle, die der Mist selbst bei der Schadstoffmobilität spielt.

Björn Berendsen (Ph.D.) diskutierte die Wege, die Tierarzneimittel, wie z. B. Antibiotika, in der Umwelt aufnehmen und wer oder was ihnen ausgesetzt ist.

Nach der Bodenausbringung durch Gülle wird ein Teil vom Boden adsorbiert, ein anderer Teil wird abgebaut und möglicherweise inaktiv gemacht, und schließlich wird ein Teil von Nutzpflanzen aufgenommen oder ins Oberflächenwasser ausgewaschen. Die beiden letztgenannten Wege setzen sowohl Menschen als auch Nutztiere oder im Wasser lebende Organismen den Schadstoffen aus. Er stellte eine Studie vor, in der Persistenz, Abbauprodukte und Mobilität mehrerer häufig verwendeter Antibiotika untersucht wurden. Bei fast allen Verbindungsgruppen (Tetracycline, Chinolone, Makrolide, Lincosamide und Pleuromutiline) wurde festgestellt, dass sie länger als sechs Monate bestehen bleiben – drei davon länger als ein Jahr. Nur Sulfonamide schienen weniger persistent zu sein, wurden jedoch manchmal länger als drei Monate nachgewiesen. Die Untersuchung von Abbauprodukten zeigte, dass diese noch aktive Eigenschaften haben können, wie im Fall von Tylosin. Seine Abbauprodukte erwiesen sich als antimikrobiell wirksam. Die Mobilitätsexperimente zeigten, dass die Mobilität von der Bodenart abhängt. Dies wurde von Prof. Sören Thiele-Bruhn bestätigt, der auch seine Forschung zu den Auswirkungen von Gülle auf die Mobilität von Schadstoffen im Boden hinzufügte. Gülle – insbesondere Schweinegülle – enthält gelöste organische Stoffe mit Schwebstoffen, mobile Kolloide, die den Transport anderer gelöster Stoffe erleichtern. Auch die Eigenschaften der Arzneimittel, wie etwa die Wasserlöslichkeit der Verbindungen, können bei der Mobilität eine Rolle spielen.

Eine Reduzierung des Einsatzes von Antibiotika, ein erhöhter Einsatz von Desinfektionsmitteln kann jedoch zum gegenteiligen Effekt führen.

Quartäre Ammoniumverbindungen (QACs) und quartäre Alkylammoniumverbindungen (QAACs) sind eine Art Desinfektionsmittel, die das Risiko einer Zunahme von Antibiotikaresistenzen erhöhen können. Dr. Ines Mulder stellte Forschungsergebnisse zum Vorkommen von QAACs in der Umwelt vor. Sie wurden insbesondere im Zusammenhang mit der COVID-19-Pandemie häufig eingesetzt und sind sogar in abgelegenen Gebieten zu finden. Dr. Stefanie Glaeser präsentierte die kombinierte Forschung zu den Auswirkungen von Antibiotika und Desinfektionsmitteln auf Antibiotikaresistenzen anhand von Input- und Output-Proben einer Biogasanlage. Obwohl potenzielle pathogene Bakterien und Antibiotikaresistenzgene reduziert zu sein scheinen, gibt es noch unbekannte Faktoren mit unbekanntem Risiko.



Abbildung 4.7 -1: Online-Zuschaltung im Workshop

Überwachungsansätze – für den Fall, dass die Schadstoffe (höchstwahrscheinlich) bekannt sind, und für den Fall, dass sie unbekannt sind.

Assoc. Prof. Martin Hansen führt Non-Target-Analysen von Tausenden Substanzen, u.a. Pharmaka durch. Sein Team kann größere Mengen potenzieller Schadstoffe identifizieren. Hohe Konzentrationen könnten analysiert werden, um deren Risiko beurteilen zu können. Der Test beginnt auch mit dem Aufbau einer Datenbank, auf die in Zukunft zugegriffen werden kann, wenn der Verdacht besteht, dass ein Material gefährlich ist.

Björn Berendsen stellte seine Arbeit zur Überwachung von Antibiotikarückständen bei Geflügel anhand der Untersuchung der Federn vor. Er konnte unterschiedliche Mengen an Antibiotika bei unterschiedlichen Verabreichungstechniken identifizieren. Er machte mehrere Vorschläge für wirksame Instrumente zur Überwachung (bekannter Substanzen):

- Richtlinien und Gesetze (z. B. die Regelung, dass einem Betrieb ein Tierarzt zugewiesen sein muss)
- Umsatzdaten (in der Regel kein vollständiges Bild)
- Notwendigkeit der Durchsetzung

Prof. Hansen präsentierte auch Beispiele dafür, wie seine Laboranalysen pragmatisch auf landwirtschaftlichen Betrieben angewendet wurden, und ermutigte zur korrekten Anwendung, beispielsweise zu landwirtschaftlichen Tests mit speziell entwickelten Lateral-Flow-Tests, die innerhalb von Minuten Ergebnisse liefern können. Ein unerwartetes Ergebnis kann zu einem aufschlussreichen Gespräch mit dem Landwirt führen.



Abbildung 4.7 - 2: Workshoppräsentation (Dr. Berendsen, Wageningen)

Brainstorming-Sitzung

Der Gruppe wurde eine Liste mit Fragen vorgelegt, um das für sie interessanteste Thema auszuwählen: Ist es trotz der Schwierigkeit, die Komplexität der Antibiotikarückstände ARB und ARG zu verstehen, möglich, allgemeine Empfehlungen zur Risikovermeidung zu geben?

Die Diskussion drehte sich schnell um Methoden zur Reduzierung des Einsatzes und nicht um Behandlungsmethoden zum Abbau oder zur Eliminierung von Antibiotika im Mist oder Gärrest, da die Ergebnisse sehr unterschiedlich waren – was es praktisch unmöglich machte, eine Behandlung für alle Verbindungen zu empfehlen.

Es wurde eine Darstellung der Hauptakteure erstellt, die entweder aktuell in der Antibiotikakette eine Rolle spielen oder könnten (da sie davon betroffen sind) (vgl. *Anhang*). Generell wurde festgestellt, dass wir von Best Practices aus anderen Ländern lernen könnten, beispielsweise von den von Björn Berendsen vorgestellten Überwachungsmethoden.

Hofbesitzer und Tierarzt stehen im Mittelpunkt des Diagramms, eine lange Liste von Änderungen wurde vorgeschlagen. Um sie herum sind die Rahmenbedingungen gegeben, die erforderlich sind, um dem Landwirt die Veränderungen zu ermöglichen. Beispielsweise müssen die Verbraucher aufgeklärt werden, damit sie die Bedeutung tierischer Lebensmittel ohne Antibiotika verstehen und sich dafür einsetzen. Die Politik sollte Leitlinien setzen und den ökologischen Landbau fördern. Wenn Druck von Verbrauchern und Regierung auf die Lebensmittelindustrie ausgeübt wird, könnte sie auch als gute Überwachungsinstanz fungieren. Grundstückseigentümer (in vielen Fällen auch Landwirte) sollten bei der Ausbringung und Düngung mit Gülle ohne Antibiotika rechnen können. Auch hier ist Aufklärung erforderlich.

5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Neben Recherchen zu analytischen Entwicklungen standen umfangreiche Recherchen zu den aktuell relevanten antibiotischen Substanzen, Metaboliten und Transformationsprodukten im besonderen Fokus, insbesondere auch im Vergleich zu den Erstrecherchen in *Abiotec I*. Hierzu wurden erneut Befragungen und Gespräche mit Behörden, Tierärzten und Agrarbetrieben zum Einsatz der Antibiotika bei Geflügel, Schwein und Rind geführt. Aufbauend auf dem Thüringer Antibiotika-Monitoring (TLLR) und den Erkenntnissen aus *Abiotec I* konnten somit weitergehende Aktualisierungen vorgenommen werden.

Die Weiterentwicklung einer geeigneten Messmethode für antibiotische Substanzen inkl. ihrer Metaboliten und Transformationsprodukte stand im Mittelpunkt der analytischen Arbeiten im Projekt *Abiotec II* an der MFPA Weimar. Neben der umfangreichen Beschaffung von Referenzmaterial führten die Arbeiten zu einer selektiven und sensitiven Messmethodik.

Die Methodenentwicklung im Rahmen des Nachweises der antibiotischen Stoffe und ihrer Metaboliten gestaltete sich als wesentlich aufwendiger und zeitintensiver als ursprünglich erwartet. Die Analytik konnte durch zahlreiche Optimierungen auf "sichere Beine" gestellt werden. Der Nachweis von Metaboliten und Transformationsprodukten liefert wichtige Hinweise über die jeweiligen Abbauprozesse der Ausgangssubstanzen und deren Dynamik.

Fragen der Entwicklung der Probenvorbereitung und Methodvalidierung wurden intensiv bearbeitet. Das analytisch sehr kritische Problem der Metaboliten und Transformationsprodukte konnte trotz der Vielfalt an Substanzen und der damit verbundenen Kosten intensiv bearbeitet werden. Die Ergebnisse ermöglichen die Weiterentwicklung des Normentwurfes aus *Abiotec I*. Die Entwicklung einer verlässlichen Methode ist die Voraussetzung für die sichere Bewertung von Verfahrensansätzen zur Reduzierung antibiotisch wirkender Substanzen in Wirtschaftsdünger und Agrarböden.

Die Agrarbetriebe stellten den Wirtschaftsdünger bereit und waren beratend projektintegriert. Sie wurden permanent über den Fortgang des Projektes informiert. Vier interne Projekt-Workshops konnten trotz „Corona“-Einschränkungen durchgeführt werden.

Im Rahmen der Projekte *Abiotec I* und *II* (aber auch *Ameditec*; vgl. auch Tab. 5) konnte nachgewiesen werden, dass der aerobe Abbau bzw. die Elimination relevanter Veterinärwirkstoffe verfahrenstechnisch machbar und umsetzbar sind, wobei einzelne Substanzen gut bis sehr gut (z.B. *Cephalosporine*, *Penicilline*) andere auffallend schwerer abbaubar (z.B. *Fenicole*, *Fluorchinolone*) sind. Dies ist für die veterinärmedizinische Praxis interessant und sollte künftig auch bei der Auswahl der Wirkstoffe berücksichtigt werden (Kriterium der Abbaubarkeit von Wirkstoffen).

Der aerobe Abbau von Pharmaka durch sog. „Höhere Pilze“ (Basidiomyceten) und Kompostierung wurde bereits näher untersucht (Arikan, 2008; Mitchel et al., 2015; Castellet Rovira et al., 2018). Im Rahmen des Projekts *Abiotec II* konnten insbesondere verschiedene Schimmelpilze in einzelnen Versuchsvarianten mit Stroh in auffälliger Weise nachgewiesen werden (vgl. auch Leathers et al., 2017). Da Antibiotika die Bakterien hemmen, können (theoretisch) keine wesentlichen Abbauleistungen seitens der Bakterienflora erwartet werden.

Tabelle 5: Gegenüberstellung der Projekte ABIOTEC/AMEDITEC und AGROPrax

Kategorie	ABIOTEC / AMEDITEC	AGROPrax
Substrat	Wirtschaftsdünger, Schwerpunkt stabilisierte Substrate, z.B. Gärrest	Gärrest; Berücksichtigung der Düngeverordnung
Verfahren	Verschiedene Konzepte (labor-, klein-technischer und in Ansätzen halbtechnischer Maßstab)	Gärrest- Entwässerung bzw. Vererdung, Gärrest- Verstrohung, Schnellhumus, Untersaaten bei NawaRo;
Agrarbetrieb	Empfehlungen	Vorbereitung Handreichung / Leitfaden
Wesentliche weitere Aspekte des Projekts	Erfassung des Vorkommens bakterieller Resistenz, Prüfung des Vorkommens von Resistenzen, Untersuchung von human-/veterinärmedizinisch relevanten sowie phytopathogenen Organismen, Entwicklung und Kombination von kulturellen und molekularbiologischen Methoden	Aufbau Prüfstand mit integrierter Sensorik, Lysimeteruntersuchungen; gezielte Förderung des Boden- Mikrobioms (Hyphenpilze, Actinomyceten); PCR/ Metagenomik; Unknown-Screening zu „Leitmetaboliten“; hochauflösende Massenspektrometrie Q-TOF; angepasste Toxizitätstests; begleitende Nährstoffanalytik
Anbaubezug	Klein-, halbtechnischer Maßstab	Vorbereitung zur Überführung in Praxis
Abbau Veterinärpharmaka	Gut und schwer abbaubare Antibiotika (Beta-Lactame, Fluorchinolone), weitere nicht-antibiotische Pharmaka, Metaboliten, Transformationsprodukte	Unknown-Screening: Breites, definiertes Spektrum Veterinärpharmaka, insbesondere typische „Leitsubstanzen“ zur Definition und Charakterisierung der Abbauprozesse
Probenmatrix	Schwerpunkt Gärrest aus Biogasanlage	Gärrest und Festsubstrat (Entwässerung/ Vererdung; Vermistung)

Die „anaerobe Vorbehandlung“ von flüssigem Roh- Wirtschaftsdünger in der Biogasanlage und damit der enthaltenen Nährstoffe und pharmazeutischen Wirkstoffe, die quasi als Nebeneffekt erfolgt, trägt zur stofflichen Stabilisierung des Wirtschaftsdüngers bei. Zugleich ist es eine Chance zur (Teil)Eliminierung im Bioenergiesystem und damit ein Baustein zur Vermeidung bzw. Reduzierung von Folgeschäden. Allerdings reicht die anaerobe Eliminierung bei Weitem nicht aus (Alvarez *et al.*, 2010; Spielmeier, 2019). Mehrere Forschungsarbeiten konnten mittlerweile den Abbau verschiedener anthropogener Spurenstoffe in aerobem Milieu (Kümmerer *et al.*, 2000; UBA, 2014; Taheran *et al.*, 2016) nachweisen und als wichtigen Milieuanpruch darstellen.

Hinsichtlich der Bedeutung des aeroben (Verfahrens-) Milieus haben der spezifische Einsatz von Strohanteilen, der obere, intensiv belebte Bodenbereich, die Transformation von betriebseigenem Flüssigdünger (hauptsächlich Gärrest) in Festsubstrat über solare Entwässerung/Vererdung sowie die damit verbundene Reduzierung der Transportkosten (Ausbringung) eine nicht unerhebliche, praxisrelevante Bedeutung. Wie im Projekt *Abiotec II* gezeigt werden konnte, kann mit Entwässerung bzw. Vererdung das Volumen von Gärrest auf einen sehr geringen Teil reduziert werden. Begleitende Untersuchungen hinsichtlich der Nährstoffgehalte und Charakterisierung des Entwässerungsprozesses sowie bezüglich der Rückstände von Pharmaka im entstehenden „Gärrest- Kuchen“ sind noch offen und sollen im Projekt *AGROPrax* untersucht werden. Eine entsprechende Kopplung von Maßnahmen der aeroben und anaeroben Gärrestaufbereitung sind also mit Blick auf die Reduzierung des Spurenstoffeintrags in die Umweltsysteme sinnvoll.

In weiterführenden „Fassversuchen“ zur Kompostierung und Vererdung sollte auf die Verbreitung der spezifischen Resistenz gegen die ausgewählten Antibiotika in den unterschiedlichen Bakteriengruppen untersucht werden. Die Prüfung von Enterobacteriaceae und Enterokokken als Indikatoren kann die Entwicklung der mikrobiellen Flora anzeigen. Daneben und somit ergänzend sollte in den verschiedenen Versuchsproben auf das Auftreten phytopatogener Pilze untersucht werden. Sowohl der Aufbau bakterieller Resistenzen, wie auch das Auftreten phytopathogener Pilze konnten dabei nicht nachgewiesen werden.

Deren weitere Beobachtung und nähere Charakterisierung wird ein Baustein zukünftiger Untersuchungen, z.B. im Projekt *AGROPrax* sein. Die Auswahl von Indikatoren als Basis für eine praktikable Prüfroutine zur Hygienisierung und Resistenzausbringung sollte in die Untersuchungen der Prozessstadien einfließen (vgl. *Pospiech et al.*, 2014).

Eine wesentliche Überlegung für die spätere praxisnahe Umsetzbarkeit der Ergebnisse des Vorhabens war, den Agrarbetrieben ein Prozedere zur Verfügung zu stellen, das einfach und kostengünstig mit eigenen Kapazitäten realisier- und betreibbar ist.

Das Projekt stellt insgesamt einen innovativen Beitrag zum umfassenden Grundwasser- und Bodenschutz dar. Über die umfängliche Schutzwirkung auf den Kreislauf Boden/Pflanze/Grundwasser ist damit auch die positive Wirkung auf Tierwohl und -gesundheit direkt und indirekt gegeben.

Die sehr positive, immer vertrauliche und kooperative Zusammenarbeit und der regelmäßige Erfahrungsaustausch mit dem Thüringer Landesamt für Landwirtschaft und Ländlichen Raum (insbesondere Labor und Innovationsdienstleister) sowie der Thüringer Aufbaubank, auch im Rahmen der internen Workshops und Gespräche, erwies sich als sehr wichtig und projektunterstützend.

Thesen

Die nachfolgend genannten Thesen bzw. Erkenntnisse aus *Abiotec II* (ergänzend zu Vorprojekten), mittlerweile auch bestätigt in der nationalen und internationalen Literatur, unterstreichen die Notwendigkeit und Sinnhaftigkeit der Projektziele im Rahmen eines fortführenden praxisorientierten Projekts:

- Die Eliminierung bzw. Reduktion von pharmazeutischen Spurenstoffen durch Bodenpilze ist ein wesentliches Prinzip der Selbstreinigungskräfte in natürlichen Umweltkompartimenten wie auch analoge Untersuchungen bestätigten (*Asif et al.*, 2017). Deren gezielte Förderung lässt sich unmittelbar daraus ableiten.
- Die direkte Ausbringung (vergorener) Wirtschaftsdünger (ggf. nach Zwischenlagerung), eingearbeitet in die obere Bodenschicht, insbesondere auch direkt nach der Ernte („Stoppelacker“ ohne wachsende Kultur), ist aus Sicht der mikrobiellen Umsetzungen und Metabolisierungsprozesse von Veterinärpharmaka sinnvoll. Äußere Umweltbedingungen wie Boden- Temperatur und Feuchtigkeit beeinflussen die Abbauprozesse und sollten daher zukünftig begleitend untersucht werden (Sensorik).

- Die solare Entwässerung von flüssigem Wirtschaftsdünger reduziert Lagerkapazitäten sowie Verbringungskosten und stabilisiert den Nährstoffgehalt (Vorversuche, vgl. Abb. 5).



Abbildung 5: Entwässerung und Vererdung

- Die eingesetzten pharmazeutischen Wirkstoffe lassen sich hinsichtlich ihrer Anwendung in einerseits gut bis sehr gut abbaubare und andererseits schwerer abbaubare Substanzen bzw. Wirkstoffgruppen unterteilen, was unter Berücksichtigung ihrer Metaboliten und Transformationsprodukte bestätigt wurde. Dies kann mittel- und langfristig für deren veterinärmedizinische Anwendung von Bedeutung sein.

Wissenschaftlich diskutiert und nachgewiesen sind weitere wichtige Aspekte im Zusammenhang mit der Ausbringung pharmakabelasteter Wirtschaftsdünger. Sie sollen im Kontext des Nachfolgeprojekts Berücksichtigung finden:

- Die Vergärung von Gülle vor Ausbringung führt zur Stabilisierung der Substratmatrix, der Nährstoffe und einer weitreichenden Hygienisierung und ist daher seitens der Agrarbetriebe anzustreben. Die Projektarbeiten mit Gärrest waren zugleich eine „Musterlösung“ für weitere Flüssigdünger, die im Nachfolgeprojekt Berücksichtigung finden können.
- Pharmazeutische Substanzen werden durch Erosion und Versickerung von landwirtschaftlichen Flächen in Oberflächengewässer, aber auch in das Grundwasser überführt, was ein potenzielles Risiko für die menschliche Gesundheit bedeuten kann (*Hannappel und Karfousehr 2017*). Ihre Konjugate oder Metaboliten können in den Umweltkompartimenten ggf. über längere Zeiträume verbleiben (*Hannappel et al. 2014b*).
- Für einige Wirkstoffe, die im Boden oder im Wasser nicht mehr nachweisbar sind, besteht der Verdacht, dass sie nicht vollständig abgebaut, sondern in (unbekannte) Metaboliten und Transformationsprodukte umgewandelt werden. Diese können u.U. in ihrer (toxikologischen) Wirkung ebenso kritisch sein. Daher sind Kenntnisse und das Wissen um Metaboliten ein wichtiger umweltpolitischer und –toxikologischer Aspekt. Zugleich macht er Ansätze zu pharmakastofflichen Bilanzierungen erst möglich.

6 Zusammenfassung

In der Tierhaltung werden Antibiotika therapeutisch eingesetzt. Bei der zunehmend an Bedeutung gewinnenden stofflichen Nutzung der Wirtschaftsdünger gelangen diese, ihre Metaboliten und Transformationsprodukte auf die Böden, erfahren dort weitere stoffliche Umsetzungen und können ggf. die Kulturpflanzen, den Wasserkreislauf inkl. das Grundwasser kontaminieren. Umfangreich angelegte Recherchen und Gespräche mit Landwirten und Veterinärmediziner zu den in der Praxis bei Schwein, Huhn und Rind in Thüringen eingesetzten Substanzen bestätigten die Tendenz hin zu Wirkstoffen, die bei Applikation im niedrig dosierten Bereich liegen. Dies kommt mit Blick auf die Problematik von Antibiotikaresistenzen dem gesamtgesellschaftlichen Ziel einer Reduzierung der eingesetzten Tonnagen entgegen.

Die Weiterentwicklung einer ausreichend empfindlichen, dennoch robusten und innovativen matrix-unabhängigen Analytik inkl. optimierter Probenvorbereitung als notwendige Voraussetzung für den Nachweis des Abbaus der sehr heterogenen Wirkstoffe, ihrer Metaboliten und Transformationsprodukte in den einerseits verschiedenen und andererseits komplexen und analytisch schwierigen Matrices Gülle, Gärrest und Festmist wurde im Rahmen des Projektes intensiv verfolgt. Mit der LC-MS- Methode konnten bei vertretbarem, optimiertem Aufwand große Probenmengen hinsichtlich des Spektrums an eingesetzten Wirkstoffen, ihrer Metaboliten und Transformationsprodukte untersucht werden. Eine Bilanzierung der Stoffströme z.B. bei Gülle- verwertenden Biogasanlagen wird zukünftig möglich. Begleitend wurden hygienisch- mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt und die PCR- Methodik im Projektverlauf entwickelt. Der Aufbau bakterieller Resistenzen, wie auch phytopathogene Pilze konnten nicht nachgewiesen werden.

Aerobe verfahrenstechnische und in der Praxis für den Agrarbetrieb zukünftig umsetzbare Ansätze für agrobiotechnologische Behandlungsstufen von Wirtschaftsdünger, die die Konzentrationen von Antibiotika und ihrer Abbauprodukte im Wirtschaftsdünger signifikant reduzieren, konnten im Labor- und kleintechnischen Maßstab fortgeführt und weiterentwickelt werden. Der Einsatz von Strohanteilen zum Flüssigdünger war dabei entscheidend. Ein technologisch umsetzbares und ökonomisch vertretbares Verfahren bzw. dessen Varianten für den Einsatz in landwirtschaftlichen Unternehmen zur Reduzierung antibiotisch wirksamer Substanzen, ihrer Metaboliten und Transformationsprodukte zeichnen sich ab. Im Rahmen aktueller, energiepolitischer Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen sollten sie in den halb- und großtechnischen Maßstab überführt werden können.

Ziel des in Weimar durchgeführten internationalen Workshops war es, Messmethoden und Herausforderungen beim Einsatz von Veterinärantibiotika zu erörtern und Strategien zum Umgang mit der Problematik ihres Einsatzes zu reflektieren. Thematisiert wurden die Wirkung von Antibiotika auf den Boden, die Veränderung des Bodenmikrobioms und Probleme im Zusammenhang mit dem Auftreten von Antibiotikaresistenzen, aber auch Auswirkungen ausgewählter Behandlungsmöglichkeiten sowie Ansätze im Rahmen einer fruchtbaren Kommunikation zwischen Behörden, Landwirten und Tierärzten. Der Workshop gestaltete sich aus der Sicht aller Beteiligten als voller Erfolg.

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

7 Literaturverzeichnis

Achermann, S.; Bianco, V.; Mansfeldt, C.B.; Vogler, B.; Kolvenbach, B.A.; Corvini, B.F.X.; K. Fenner (2018): Biotransformation of Sulfonamide antibiotics in activated sludge: The formation of Pterin-conjugates leads to sustained risk. *Environ Sci Technol* 52 (11): 6265 – 6274.

Achermann, S. (2019): Biotransformation of Sulfonamide antibiotics in activated sludge. Workshop *Antibiotics in Manure and Digestate*, Weimar, January 10th – 11th.

Aiken, A.M.; Allegranzi, B.; Scott, J.A.; Mehtar, S.; Pittet, D.; H. Grundmann (2014): Antibiotic resistance needs global solutions. *Lancet Infect Dis.* 14 (7): 550-1. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70709-1.

Allen H.K.; J. Trachsel; T. Looft; T. A. Casey (2014): Finding alternatives to antibiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1323: 91-100. doi: 10.1111/nyas.12468.

Arikan, O.A.; Mulbry, W.; C. Rice (2008): Management of antibiotic residues from agricultural sources: use of composting to reduce chlortetracycline residues in beef manure from treated animals. *J Hazard Mater* 164 (2-3): 483 – 489.

Alvarez, J.A.; Otero, L.; Lema, J.M.; F. Omil (2010): The effect and fate of antibiotics during the anaerobic digestion of pig manure. *Bioresource Technology* 101 (22): 8581 – 8586.

Bengtsson-Palme, J.; D.G.J. Larsson (2015): Antibiotic resistance genes in the environment: prioritizing risks. *Nature Rev Microbiol* 13: 396.

Benítez T., Rincón A M., Limón M. C., A.C. Codón (2004): Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol* 7: 249-260.

Berendsen, B. J. A.; Wegh, R. S.; Memelink, J.; Zuidema, T.; A.A.M. Stolker (2015). The analysis of animal feces as a tool to monitor antibiotic usage. *Talanta* 132: 258–268. doi: 10.1016/j.talanta.2014.09.022.

BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) 2011: Resistenzen gegen Antibiotika bekämpfen. 10. BfR-Forum Verbraucherschutz, 23./24. November.

Boix, C.; Ibanez, M.; Sancho, J.V.; N. Leon (2019): Qualitative screening of 116 veterinary drugs in feed by liquid chromatography-high solution mass spectrometry: Potential application to quantitative analysis. *Food Chemistry* 160: 313 – 320.

Bottoni, P.; S. Caroli, S.; A.B. Caracciolo (2010). Pharmaceuticals as priority water contaminants. *Toxicology & Environmental Chemistry*. 92 (3): 549-565.

Boxall, A.B.; Fogg, L.A.; Blackwell, P.A.; Kay, P.; Pemberton, E.J.; A. Croxford (2004): Veterinary medicines in the environment. *Rev Environ Contam Toxicol* 180: 1 – 91.

Boxall, A.B.; Johnson, P.; Smith, E.J.; Sinclair, C.J.; Stutt, E.; L.S. Levy (2006): Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *J Agric Food Chem* 54 (6): 2288 – 2297.

Boxall, A.B. (2019): Fate and effects of veterinary medicines emitted to the environment in manure and slurries. Workshop *Antibiotics in Manure and Digestate*, Weimar, January 10th – 11th.

BTK (2015): Bundestierärztekammer e.V.: Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln – mit Erläuterungen.

BVL (2022): Deutlich geringere Abgabemengen von Antibiotika in der Tiermedizin, Berlin.

Carballa, M.; Omil, F.; Ternes, T.; J.M. Lema (2007): Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Research* 41 (10): 2139 – 2150.

Carter, L.J.; C.A. Kinney (2018): *Terrestrial Ecotoxicity, Health Care and Environmental Contamination*. 10.1016/B978-0-444-63857-1.00005-X, (69-85).

Christou, A.; Agüera, A.; J.M. Bayona; Cytryn, E.; Fotopoulos, V.; Lambropoulou, D.; Manaia, C.M.; Costas, M.; Revitt, M.; Schröder, P.; D. Fatta-Kassinos (2017a): The potential implications of reclaimed water reuse for irrigation on the agricultural environment: the knowns and unknowns of the fate of antibiotics and antibiotic resistant bacteria and resistant genes – A review. *Water Research* 123: 448 – 467.

de Jong, J.; Bos, J.H.J.; de Vries, T.W.; L.T.W. de Jong-van den Berg (2014): Use of antibiotics in rural and urban regions in the Netherlands: an observational drug utilization study. *BMC Public Health* 14: 677.

Deutscher Bundestag (2018): Unser Wasser vor multiresistenten Keimen schützen. BT- Drucksache 19/1159.

EC (2010): VERORDNUNG (EU) Nr. 37/2010 DER KOMMISSION vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Amtsblatt Europäische Kommission, Brüssel.

EU (2021): Delegierte Verordnung 2021/578 der Kommission vom 29.01.2021 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2019/6 des Europäischen Parlaments und des Rates im Hinblick auf Anforderungen an die Erhebung von Daten über das Verkaufsvolumen und die Anwendung von antimikrobiellen Arzneimitteln bei Tieren, ABl. EU, L 35/7: 2022/209.

Farre' la, M.; Kantiani, L.; Perez, S.; D. Barcelo (2008): Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC Trend in Analytical Chemistry* 27 (11): 991 – 1007.

Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., Sommer, M. O. A.; G. Dantas (2012): The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science* 337, 1107–1111. doi: 10.1126/science.1220761.

Forslund, K.; S. Sunagawa; J. R. Kultima; D. R. Mende; M. Arumugam; A. Typas; P. Bork (2013): Country-specific antibiotic use practices impact the human gut resistome. *Genome Res.* 23: 1163-1169. doi: 10.1101/gr.155465.113.

Galera-Laporta, L.; J. Garcia-Ojalvo (2020): Antithetic population response to antibiotics in a polybacterial community. *Sci. Adv.* 6: eaaz 5108.

Gaze, W.; M. Depledge (2017): Antimicrobial resistance: Investigating the environmental dimension. UN Environmental Frontiers Report: Emerging issues of environmental concern: 12 – 20.

Gough, E.K.; Moodie, E.E.; Prendergast, E.J.; Johnson, S.M. et al. (2014): The impact of antibiotics on growth in children in low and middle income countries: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ.* 348: 1-13.

Grote, M.; Schwake-Anduschus, C.; Michel, R.; Stevens, H.; Heyser, W.; Langenkämper, G.; Betsche, T.; M. Freitag (2007): Incorporation of veterinary antibiotics into crops from manured soil. *Landbau-forschung Völknerode* 57: 25 – 32.

- Gutierrez, I.R.; Watanabe, N.; Harter, T.; Glaser, B.; M. Radke (2010): Effect of sulfonamide antibiotics on microbial diversity and activity in a Californian Mollic Haploxeralf. *J Soil Sci Sedim* 10 (3): 537 – 544.
- Halling-Soerensen, B.; Nielsen, N.S.; Lanzky, P.F.; Ingerslev, F.; Holten Lützhöft, H.C.; S.E. Jørgensen (1998): Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review: *Chemosphere* 36 (2): 357 – 393.
- Hammesfahr, U.; Kotzerke, A.; Lamshöft, M.; B.-M. Wilke (2011): Effects of sulfadiazine-contaminated fresh and stored manure on a soil microbial community. *Europ J Soil Biol* 47: 61 – 68.
- Hamscher, G.; S.A.I. Mohring (2012): Veterinary drugs in soil and in the aquatic environment. *Chemie Ingenieur Technik* 12 (7): <https://doi.org/10.1002/cite.201100255>.
- Heberer, T.; Zühlke, S.; B. Fanck (2004): Arzneimittelrückstände in der aquatischen Umwelt. *LaborPraxis* 28 (3): 16 – 21.
- Heuer, H., Solehati, Q., Zimmerling, U., Kleineidam, K., Schlöter, M., Müller, T., et al. (2011b). Accumulation of sulfonamide resistance genes in arable soils due to repeated application of manure containing sulfadiazine. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2527–2530. doi: 10.1128/AEM.02577-10
- Jakimska, A.; A. Kot-Wasik; J. Namiesnik (2014): The Current State-of-the-Art in the Determination of Pharmaceutical Residues in Environmental Matrices Using Hyphenated Techniques. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 44 (3): 277–298.
- Jechalke, S.; Kopmann, C.; Rosendahl, I.; Groeneweg, J.; Weichert, V.; Krögerrecklenfort, E.; Brandes, N.; Nordwig, M.; Ding, G.-C.; Siemens, J.; Heuer, H.; K. Smalla (2013): Increased abundance and transferability of resistance genes after field application of manure from sulfadiazine-treated pigs. *Appl Environ Microbiol* 79 (5): 1704 – 1711.
- Jechalke, S., Focks, A., Rosendahl, I., Groeneweg, J., Siemens, J., Heuer, H., et al. (2014a): Structural and functional response of the soil bacterial community to application of manure from difloxacin-treated pigs. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87: 78–88. doi: 10.1111/1574-6941.12191.
- Jechalke, S.; Heuer, H.; Siemens, J.; Amelung, W.; K. Smalla (2014b): Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends Microbiol* 22 (9): 536 – 545.
- Jindal, A.K.; Brig, Y.S.M.; Pandya, K.M.; I.D.M. Khan (2015): Antimicrobial resistance: A public health challenge. *Med J Armed Forces India* 71 (2): 178 – 181.
- Koba, O., Golovko, O., Kodešová, R., Fér, M., and R. Grabic (2017): Antibiotics degradation in soil: a case of clindamycin, trimethoprim, sulfamethoxazole and their transformation products. *Environ. Pollut.* 220: 1251–1263. doi: 10.1016/j.envpol.2016.11.007.
- Kools, S.A.E.; A.B.A. Boxall, J.F. Moltmann, G. Bryning, J. Koschorreck, T. Knacker (2008): A ranking of European veterinary medicines based on environmental risks. https://doi.org/10.1897/IEAM_2008-002.1.
- Kotzerke, A., Hammesfahr, U., Kleineidam, K., Lamshöft, M., Thiele-Bruhn, S., Schlöter, M. et al. (2011): Influence of difloxacin-contaminated manure on microbial community structure and function in soils. *Biol. Fertil. Soils* 47,177–186. doi: 10.1007/s00374-010-0517-1.
- Kumar, K.; S. C. Gupta; S. K. Baidoo; Y. Chander; C. J. Rosen (2005): Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *J. Environ. Qual.* 34(6): 2082-5. doi: 10.2134/jeq2005.0026.

Kümmerer, K.; Al-Ahmad, A.; V. Mersch-Sundermann (2000): Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere* 40 (7): 701 – 710.

Kümmerer, K. (2004): Resistance in the environment. *J Antimicrob Chemother* 54 (2): 311 – 320.

Kümmerer, K. (2008): Pharmaceuticals in the environment – A brief summary. In: *Pharmaceuticals in the environment* (pp. 3 – 21).

Kümmerer, K. (2010): Pharmaceuticals in the environment. *Annu Rev Environ Res* 35: 57 – 75.

Laxminarayan, R.; Adriano Duse, Chand Wattal, Anita K M Zaidi, Heiman F L Wertheim, Nithima Sumpradit, Erika Vlieghe, Gabriel Levy Hara, Ian M Gould, Herman Goossens, Christina Greko, Anthony D So, Maryam Bigdeli, Göran Tomson, Will Woodhouse, Eva Ombaka, Arturo Quizhpe Peralta, Farah Naz Qamar, Fatima Mir, Sam Kariuki, Zulfiqar A Bhutta, Anthony Coates, Richard Bergstrom, Gerard D Wright, Eric D Brown, Otto Cars (2013): Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.* 13(12): 1057-98. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70318-9.

Leathers, T.D.; Rich, J.O.; Nunnally, M.S.; A.M. Anderson (2017): Inactivation of virginiamycin by *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol Lett* 40 (1): 157 – 163.

Llor, C.; L. Bjerrum (2014): Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Ther Adv Drug Saf.* 2014 Dec; 5(6): 229–241. doi: 10.1177/2042098614554919.

Marshall, B.M.; S.B. Levy (2011): Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol. Rev.* 24 (4): 718 – 733.

Martinez, J. L., Sánchez, M. B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., et al. (2009). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 430–449. doi: 10.1111/j.1574-976.2008.00157.x.

Massé, D.I.; N. M. C. Saady and Y. Gilbert (2014): Potential of Biological Processes to Eliminate Antibiotics in Livestock Manure: An Overview. *Animals* 2014, 4, 146-163; doi:10.3390/ani4020146.

Mitchell, S.M.; Ullman, J.L.; Bary, A.; Cogger, C.G.; Teel, A.L.; R.J. Watts (2015): Antibiotic degradation during thermophilic composting. *Water Air Soil Pollut* 226 (2): 13.

Mogensen, A.S., J. Dolfing, F. Haagensen (2003): Potential for Anaerobic Conversion of Xenobiotics, *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 82, 64-134.

Moyaert, H.; A. de Jong; S. Simjee; V. Thomas (2014): Antimicrobial resistance monitoring projects for zoonotic and indicator bacteria of animal origin: Common aspects and differences between EASSA and EFSA. *Vet. Microbiol.* 171 (3-4): 279-83. doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.038.

Nicoloff, H.; D.I. Andersson (2016): Indirect resistance to several classes of antibiotics in cocultures with resistant bacteria expressing antibiotic-modifying or –degrading enzymes. *J Antimicrob Chemother* 71 (1): 100 – 110.

NLWKN (2016): Niedersächsischer Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz: Tierarzneimittelstoffe im Grundwasser Niedersachsens, landesweite Bestandsaufnahme 1. Und 2. Halbjahr 2015. NLWKN-Betriebsstelle Hannover-Hildesheim (unveröff.).

Oller, I.; Malato, S.; J.A. Sanchez-Perez (2011): Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for wastewater decontamination – A review. *Sci Tot Environ* 409: 4141 – 4166.

- Pan, M.; L.M. Chu (2016). Adsorption and degradation of five selected antibiotics in agricultural soil. *Sci. Total Environ.* 545–546, 48–56. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.12.040.
- Panseri, S.; D'Imporzano, G.; Pognani, M.; Cavalli, M.; F. Adani (2013): Effect of veterinary antibiotics on biogas and bio-methane production. *International Biodeterioration & Biodegradation* 85: 205–209.
- Parshikov, I.; J. Sutherland (2012): Microbial transformations of antimicrobial quinolones and related drugs. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39 (12): 1731–40. DOI: [10.1007/s10295-012-1194-x](https://doi.org/10.1007/s10295-012-1194-x).
- Perez-Carrera, E.; Hansen, M.; Leon, V.M.; Björklund, E.; Krogh, K.A.; Halling-Soerensen, B.; Gonzalez-Mazo, E. (2010): Multiresidue method for the determination of 32 human and veterinary pharmaceuticals in soil and sediment by pressurized-liquid extraction and LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (3): 1173 – 1184.
- Ratsak, C.; Guhl, B.; Zühlke, S.; T. Delschen (2013): Veterinärantibiotikarückstände in Gülle und Gärresten aus Nordrhein-Westfalen. *Environ Sci Eur* 25 (1): 7.
- Reis, A.C.; Kolvenbach, B.A.; Nunes, O.C.; P.F.X. Corvini (2020): Biodegradation of antibiotics: The new resistance determinants – part I. Review article. *New Biotechnology* 54: 34 – 51.
- Reis, A.C.; Kolvenbach, B.A.; Nunes, O.C.; P.F.X. Corvini (2020): Biodegradation of antibiotics: The new resistance determinants – part II. Review article. *New Biotechnology* 54: 13 – 27.
- Sarmah, A. K.; Meyer, M. T.; A. B. A. Boxall (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65, 725–759. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.03.026
- Schwake-Anduschus, C. (2009): Untersuchungen zur Aufnahme von Antibiotika durch Nutzpflanzen. Dissertation, Universität Paderborn, Fakultät für Naturwissenschaften.
- Schiesel, S.; Lämmerhofer, M.; Lindner, W. (2010): Multitarget quantitative metabolic profiling of hydrophilic metabolites in fermentation broths of β -lactam antibiotics production by HILIC-ESI-MS/MS. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 396 (5), S. 1655–1679. DOI: 10.1007/s00216-009-3432-2.
- Selvam, A.; J.W.C. Wong (2017): Degradation of antibiotics in livestock manure during composting. In: *Current developments in Biotechnology and Bioengineering*, Eds. Wong, J.W.C.; Tyagi, R.D.; A. Pandey; Chapter 12: 267 – 292.
- Spielmeyer, A. (2019): Out of sight, out of mind – Fate of antibiotics in manure. Workshop *Antibiotics in Manure and Digestate*, Weimar, January 10th – 11th.
- Taheran, M.; Naghdi, M.; Brar, S.K.; Knystautas, E.; Verma, M.; Surampalli, R.Y.; J.R. Valero (2016): Development of adsorptive membranes by confinement of activated biochar into electrospun nanofibers. *Beilstein J Nanotechnol* 7: 1556 – 1563.
- Teeter, J.S.; R.D. Meyerhoff (2003): Aerobic degradation of tylosin in cattle, chicken, and swine excreta. *Environ Res* 93 (1): 45 – 51.
- Ternes et al. (2017): Anthropogene Spurenstoffe, Krankheitserreger und Antibiotikaresistenzen im Wasserkreislauf. TransRISK, BMBF; DWA Themen.
- Thiele-Bruhn, S. (2003): Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *J Plant Nutr Soil Sci* 166 (2): 145 – 167.

Thiele-Bruhn, S. (2019): Manure effects the fate of antibiotics in soil. Workshop *Antibiotics in Manure and Digestate*, Weimar, January 10th – 11.th

Tolzin-Banasch, K.; Bähr, R.-P.; König, V.; Leiterer, M.; R. Riedel (2015): Entwicklung und Validierung neuer Analysenverfahren zur Charakterisierung und Qualitätssicherung landwirtschaftlicher Produktionsmittel und Produkte. Arbeitspaket VI – Analytik und Bewertung von Tierarzneimittelrückständen in ausgewählten organischen Düngestoffen, Abschlussbericht, Jena.

Topp, E.; Chapman, R.; Devers-Lamrani, M.; Hartmann, A.; Marti, R.; F. Martin-Laurent et al. (2013). Accelerated biodegradation of veterinary antibiotics in agricultural soil following long-term exposure, and isolation of asulfamethazine degrading microbacterium sp. J. Environ. Qual. 42, 173–178.doi: 10.2134/jeq2012.0162.

Trevisi, E., A. Zeconi, S. Cogrossi, E. Razzuoli, P. Grossi, M. Amadori (2014): Strategies for reduced antibiotic usage in dairy cattle farms. Res. Vet. Sci. 96:229-233.

UBA (2014): Antibiotika und Antiparasitika im Grundwasser unter Standorten mit hoher Viehbesatzdichte. Umweltbundesamt Texte 27.

UBA (2018): Antibiotika und Antibiotikaresistenzen in der Umwelt. Hintergrund, Herausforderungen und Handlungsoptionen. Umweltbundesamt, Für Mensch & Umwelt.

UBA (2019): Environmental risks from mixtures of antibiotic pharmaceuticals in soils – a literature review. Final Report; Umweltbundesamt Texte 32.

Van Boeckel, T.; C. Brower; M. Gilbert; R. Laxminarayan (2015): Global trends in antimicrobial use in food animals. PNAS 112 (18) 5649-5654; <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>.

Verordnung EU (2019/6): Europäisches Parlament und Rat vom 11.12.2018. ABI. EU, L 4/43-167.

Wang, L.; Zhong, D.; Chen, G.; Tang, F.; Song, Q.; J. Zhang (2013): Determination of antibiotic residues in manure by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid phase extraction. Chinese Journal of Chromatography 31 (10): 1010 – 1015.

Westphal-Settele, K.; Konradi, S.; Balzer, F.; Schönfeld, J.; R. Schmithausen (2018): Die Umwelt als Reservoir für Antibiotikaresistenzen – ein wachsendes Problem für die öffentliche Gesundheit? Bundesgesundheitsblatt 61: 533.

WHO (2015): World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance.

Woolhouse, M.E.; M. J. Ward (2013): Microbiology. Sources of antimicrobial resistance. Science 341 (6153): 1460 – 1461.

Woolhouse, M.E.; Ward, M.J.; B. van Bunnik, J. Farrar (2015): Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci., 370.

Zhang, Y.; Li, Y.; Liu, X.; Sun, Y. (2021): Determination of multiple antibiotics in agricultural soil using a quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method coupled with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. In: *Journal of separation science*. DOI: 10.1002/jssc.202100730.

Zhuang, Y.; Hongqiang, R.; Geng, J.; Zhang, Y.; Ding, L.; K. Xu (2015): Inactivation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater by chlorination, ultraviolet, and ozonation disinfection. Environ Sci Pollut Res 22: 7037 – 7044.

Zhou, Y., Niu, L., Zhu, S., Lu, H.; and W. Liu (2017). Occurrence, abundance, and distribution of sulfonamide and tetracycline resistance genes in agricultural soils across China. *Sci. Total Environ.* 599–600, 1977–1983. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.05.152.

Zühlke, S. (2019): Mass spectrometric analyses of antibiotic residues in manure and digestate. *Workshop Antibiotics in Manure and Digestate*, Weimar, January 10th – 11th.

Danksagung

Das Team von *Abiotec II* möchte dem Thüringer Ministerium für Infrastruktur und Landwirtschaft (TMIL) und dem Projektträger Thüringer Aufbaubank (hier nach Richtlinie zur Förderung der Zusammenarbeit in der Land-, Forst- und Ernährungswirtschaft in Thüringen, LFE) für die großzügige Bereitstellung der finanziellen EU- und Landesmittel im Rahmen der Förderinitiative Ländliche Entwicklung in Thüringen, ELER, danken. In besonderer Weise gilt dies Frau Beetz und ihren MitarbeiterInnen, die stets geduldig und hilfsbereit den Projektverlauf begleiteten und unterstützten.

Ein besonderer Dank gilt dem Thüringer Landesamt für Landwirtschaft und Ländlichen Raum (ehemals TLL), insbesondere Frau Dr. Tolzin-Banasch für die sehr angenehme fachliche Begleitung, Förderung und Unterstützung. In diesem Zusammenhang sei auch ein großer Dank an Herrn Knappe, dem Gutachterausschuss sowie den Innovationsdienstleistern Herrn Hildebrandt und Frau Bader für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung gerichtet.

In besonderer Weise gilt unser interner Dank dem Team von Prof. Dr. Frank Scholwin, insbesondere Angela Clinkscales für die nicht immer einfache, aber exzellente Vorbereitung und Durchführung des Internationalen Workshops im April 2023.

Nicht zuletzt wollen wir uns in besonderer Weise bei den im Projekt integrierten Agrarbetrieben Agrargenossenschaft Diedorf/Eichsfeld e.G. und Agrargesellschaft Westhausen mbH und ihren KollegInnen für die immer sehr freundliche, offene und zuverlässige Mitarbeit und Unterstützung bedanken.

Anhang

Internationaler Workshop



WORKSHOP DOCUMENTATION

11TH INTER BALTIC BIOGAS ARENA

“Antibiotics in Manure and Digestate”

April 17th-18th, 2023

Weimar, Germany

Funded by:



Organized by:



Background and goal of the workshop

Protecting livestock in modern intensive animal husbandry is typically based on the use of specialized veterinary pharmaceuticals. Through the use of the excretion products, there is a direct or indirect application onto agricultural areas and into the water cycle.

The fermentation of manure has been investigated as a process, which could reduce the potential for environmental toxicological harm from certain substances. Unfortunately, it can also pose environmental risks. The workshop explored questions, such as “Are there other methodological approaches or procedures to reduce the pollutant input and thus to reduce the pollution?”, “Which factors should be prioritized in order to be used in everyday agricultural life?”, “Does reducing or even eliminating antibiotics solve the problem?” and perhaps most importantly – “how can we monitor it?”

On April 17th and 18th in Weimar researchers from Germany, Netherlands, Denmark and USA shared their results on topics such as how antibiotics affect soil, the alteration of the soil microbiome and the role of antibiotic resistant bacteria and genes, as well as effects they have observed in treatment options, and approaches for monitoring.

The presentations were viewed by the workshop participants in Weimar as well as online. The workshop was organized as part of a Thuringian project called ABIOTEC II, which aims to improve practical analysis of antibiotics as well as manure treatment and utilization. The project represents a cooperation between local agricultural authorities, farmers and scientific institutions.

TAKE HOME MESSAGE

- The foundational question of how to determine “safe” baseline levels of antibiotics in the environment cannot be answered conclusively. It is, however, clear that the global use of antibiotics is leading to steadily increasing antibiotic resistance and as a result an increasing number of fatalities that can be linked to it.
- Risk differs depending on the setting
- Antibiotic resistance is not confined to products from animals that received antibiotics. It can be transferred, for example, through antibiotic resistance genes, to animals that received no antibiotics.
- Monitored manure samples can contain residues of several antibiotics, even some that were not administered. Animals that are given antibiotics need to be separated from the other livestock.
- Although commonly believed to be a result of a hospital environment, there is evidence that bacteria living in the environment i.e. soil are also multi-drug resistant.
- Concerning potential treatment methods for antibiotic elimination, such as composting or anaerobic digestion, the results vary significantly for the individual pharmaceuticals. Antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes were not often affected in the same manner.
- Soil fate studies can be used to prioritise hazard assessment.
- Commonly-used antibiotics have been found to be persistent for long periods (> 6 months, > 1 year)
- Degradation products can still be active (and hazardous)
- Pharmaceuticals applied to soil behave differently than pharmaceuticals applied with manure. The manure itself can increase the mobility of contaminants due to the dissolved organic matter it contains.

- Quaternary ammonium compounds (QACs) and quaternary alkylammonium compounds (QAACs) are disinfectants, which are used in many environments – among them agriculture. The compounds can exacerbate the risk of antibiotic resistance genes developing.
- The results from potential manure treatment methods do show promising results for some substances, but antibiotic reduction is unavoidable for counteracting antibiotic resistance.

FROM THE WORKSHOP...

Setting reduction targets and assessing risk is complicated and depends on the context.

Carl Telle (M.Sc.), research associate in the Abiotec I and II research projects, opened the professional exchange with a lecture on the content and results of the two application-oriented research projects at the MFPA Weimar. In addition to methodological developments and specialized analytics, he presented the tried and tested procedural approaches and thus provided an introduction and basis for the upcoming discussion on the development of a handout with practicable measures for reducing the input of veterinary pharmaceuticals into the agricultural environment.

Lisa Durso (Ph.D.), a research microbiologist from the USDA Agricultural Research Service, discussed the very fundamental questions of assessing risk and potentially determining a level of antibiotic resistance that could be considered as a baseline.

She suggests that several antibiotic resistance mitigation strategies have been very promising, such as composting, anaerobic digestion, thermal processing and even land application – with some exceptions. The results from other researchers at the workshop took a closer look at which substances were potentially eliminated through treatment and which were not.

Carlton Poindexter (Ph.D.) presented research from his dissertation on the effects of selected manure management practices on antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes for selected antibiotics. His results showed that they did not exhibit the same behaviour under the same conditions. For example,

The fate of antibiotics in soil and the role that the manure itself plays in contaminant mobility.

Bjorn Berendsen (Ph.D.)² followed by discussing the pathways that veterinary drugs, such as antibiotics, take in the environment and who or what is exposed. After soil application through manure part is adsorbed by the soils, another part is degraded and perhaps rendered inactive and, finally, a portion is taken up by crops or leaches into surface water. The latter two pathways expose humans as well as livestock or the organisms living in the water to the contaminants.

He presented a study, in which persistence, degradation products and mobility of several commonly used antibiotics were examined. Nearly all of the compound groups (Tetracyclines, Quinolones, Macrolides, Lincosamides and Pleuromutilins) were found to persist longer than six months – three of them for more than a year. Only Sulphonamides appeared to be less persistent, however, they were sometimes detected for longer than three months. The examination of degradation products showed that they can still have active properties, such as in the case of Tylosin. Its degradation products were found to be antimicrobially active. The mobility experiments showed that mobility depended on the type of soil.

² Wageningen Food Safety Research

This was confirmed by Prof. Sören Thiele-Bruhn³, who also added his research on the effects that manure has on the mobility of contaminants in soil. Manure – in particular pig slurry – contains dissolved organic matter with suspended mobile colloids that facilitate transport of other dissolved material. The properties of the pharmaceuticals, such as water solubility of the compounds, can also play a role in the mobility.

Reducing Antibiotics, but increasing the use of disinfectants can lead to the opposite effect.

Quaternary ammonium compounds (QACs) and quaternary alkylammonium compounds (QAACs) are a kind of disinfectant, which can increase the risk of an increase in antibiotic-resistance. Dr. Ines Mulder⁴ presented research on the occurrence of QAAC's in the environment. They were widely used, especially in the context of the COVID-19 pandemic and can even be found in remote areas.

Dr. Stefanie Glaeser⁵ presented the combined research on the effects of antibiotics and disinfectants on antibiotic resistance based on input and output samples at a biogas plant. Although potential pathogenic bacteria and antibiotic resistance genes appear to be reduced, there are yet unknown factors with unknown risk.

Monitoring approaches – for the case that the contaminants are (most likely) known and for the case that they are unknown.

Assoc. Prof. Martin Hansen⁶ carries out non-target analysis of thousands (?) of substances. His team can identify larger amounts of potential contaminants. High concentrations could be analysed so that their risk could be assessed. The test also begins to establish a database, which can be accessed in the future if a material is suspected to be hazardous.

Bjorn Berendsen presented his work on monitoring antibiotic residues in poultry based on examination of the feathers. He was able to identify different loads of antibiotics from different administration techniques. He provided several suggestions for effective tools for monitoring (of known substances) as follows:

- Policy and legislation (such as regulating that there must be a veterinarian assigned to a farm)
- Data on sales (typically not a complete picture)
- Necessity of enforcement

He also presented examples of how his laboratory analysis was pragmatically applied at farms and encouraged correct use, such as at-farm testing with specially-developed lateral flow tests, which can provide results within minutes. An unexpected result can lead to an informative discussion with the farmer.

³ University of Trier, Soil Science Department

⁴ Institute of Soil Science and Soil Conservation (Chair: Prof. Jan Siemens), ifZ Giessen

⁵ Justus-Liebig Universität Giessen

⁶ Aarhus University, Department of Environmental Science

Discussion / Brainstorming session

A list of questions was presented to the group in order to select the topic deemed most interesting. The following question was selected: *Despite the difficulty of understanding the complexity of antibiotic residues, ARB and ARG, is it possible to make general recommendations for avoiding risk?*

The discussion quickly revolved around methods for reducing use and not on treatment methods for degrading or eliminating antibiotics in the manure or digestate as the results varied widely – making it essentially impossible to recommend treatment for all compounds.

An illustration of the major actors, which either currently play a role in the chain or antibiotics or could (since they are affected by it) was made (Figure 1).

In general, it was stated that we could learn from best practices from other countries, such as the monitoring methods presented by Bjorn Berendsen.

The farm owner and the veterinarian are at the center of the diagram and a long list of changes were suggested. Around them are the framework conditions that are required to make it possible for the farmer to make the changes. For example, consumers need to be educated so that they will understand the importance and push for animal food products without antibiotics. Politicians have to set guidelines and encourage organic production. If pressure from consumers and government is placed on the food industry it could also act as a good monitoring instance. Landowners (in many cases also farmers) should be able to expect manure without antibiotics for application and fertiliser. Awareness is also necessary in this case.



Figure 1 – Illustration of discussion results created by the group



Figure 2-4 – Discussion in groups on questions selected by the participants

ACKNOWLEDGMENTS

The organizing group of Institute for Biogas, Waste Management and Energy along with MFPA Weimar would like to thank all of the speakers and participants for their contributions and ideas, our ABIOTEC partners as well as the TAB (Thüringen Aufbaubank) and the ELER program for the financial support.

We would also like to thank the IBBA supporting organizations, who were critical in establishing contacts to many of the scientists involved in the workshop and letting others know about the event.

More information on the IBBA, which also organizes events on other biogas related topics, can be found at www.ibbaworkshop.eu.



Appendix – Literature for further reading

Project reports on degradation in manure

Uba Texte 80/2016 (Draft standardized test protocol see annex 1)

Harmonization of environmental exposure assessment for veterinary pharmaceuticals and biocides: ring test for validation of a draft test protocol for studies on transformation in manure. Thomas Junker, Jörg Römbke, Dieter Hennecke, Monika Herrchen, Rolf Alexander Düring, Sören Thiele-Bruhn, Maria Meinerling, Silke Fiebig, Ed Topp, Wolfgang Völkel

Link: <https://www.umweltbundesamt.de/publikationen/harmonization-of-environmental-exposure-assessment-1>

Uba Texte 79/2016

Harmonization of environmental exposure assessment for veterinary pharmaceuticals and biocides: Literature review of studies on occurrence and transformation of veterinary pharmaceuticals and biocides in manure. Rolf-Alexander Düring, Manuel Wohde, Thomas Junker, Dieter Hennecke, Monika Herrchen, Sören Thiele-Bruhn

<https://www.umweltbundesamt.de/publikationen/harmonization-of-environmental-exposure-assessment-0>

UBA Texte | 78/2016

Harmonization of environmental exposure assessment for veterinary pharmaceuticals and biocides: Influence of different experimental set-ups on observed mineralization.

Monika Herrchen, Dieter Hennecke, Thomas Junker, Rolf Alexander Düring, Sören Thiele-Bruhn

<https://www.umweltbundesamt.de/publikationen/harmonization-of-environmental-exposure-assessment>

UBA Background papers:

Antibiotics and antibiotic resistances in the environment, UBA, 10/2018

German: <https://www.umweltbundesamt.de/publikationen/antibiotika-antibiotikaresistenzen-in-der-umwelt>

English: <https://www.umweltbundesamt.de/publikationen/antibiotics-antibiotic-resistances-in-the>

AMR Workshop Brussels 07.11.2018 “Act Now – Antibiotics and Antibiotic Resistance in the Environment”

English: <https://www.ecologic.eu/16161>, German: <https://www.ecologic.eu/de/16104>

Presentation UBA Position: Options to minimize antibiotics and antibiotic resistances in the environment

https://www.ecologic.eu/sites/files/event/2018/5._klasen_j_-_uba_amr_workshop_-_brussels_7_nov_2018_0.pdf

Schönfeld, J. Konradi S. Berkner S. Westphal Settele K. UMID 2/2017 Artikel Antimikrobielle Resistenzen in der Umwelt – Gibt es Neues zum bekannten Phänomen?

https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/3240/publikationen/umid_02-2017_uba_antibiotika_0.pdf

Recommendations for reducing micropollutants in waters, UBA 2018

<https://www.umweltbundesamt.de/en/publikationen/recommendations-for-reducing-micropollutants-in>

UBA Informationsportal Tierarzneimittel in der Umwelt (Lehrmaterial, Zielgruppenorientierte Information)
<https://www.umweltbundesamt.de/tierarzneimittel>

UBA Texte Band 115/2018 Kommunikations-strategien zur Verminderung von Tierarzneimiteleinträgen aus der Landwirtschaft in die Umwelt
https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/1410/publikationen/2018-12-19_texte_115-2018_tam-kommunikation-abschlussbericht.pdf

The project "Communication Concept for Mitigating Veterinary Pharmaceutical Inputs from Agriculture into the Environment" aimed to prepare the current knowledge on the subject of the environmental impact of veterinary medicines (VETs) and measures for the environmentally conscious use and handling of VETs in a target group-oriented manner for people from agriculture and veterinary medicine.

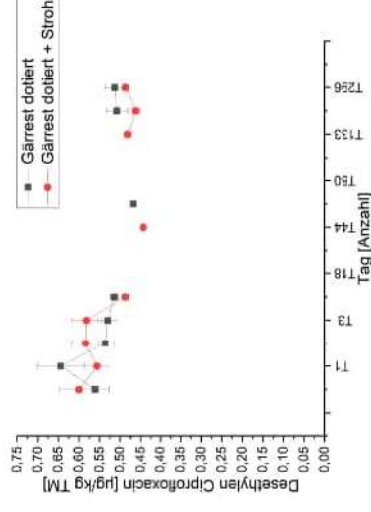
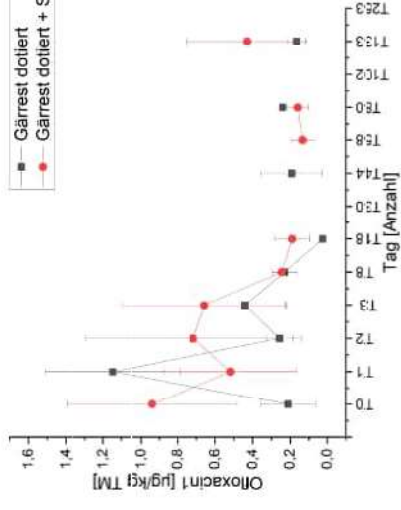
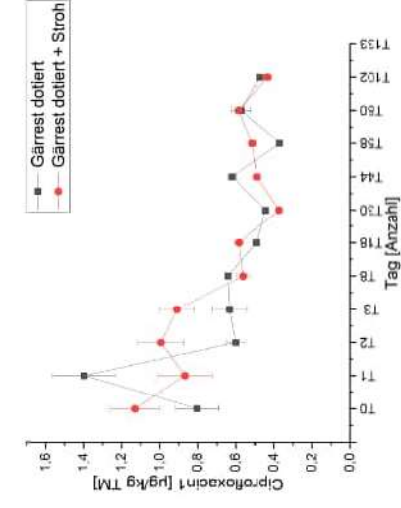
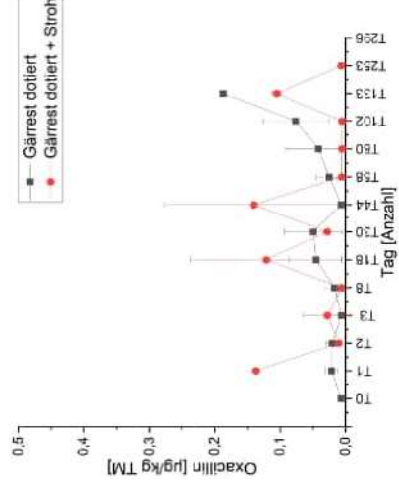
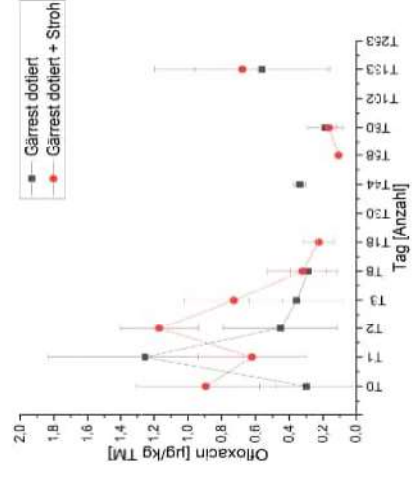
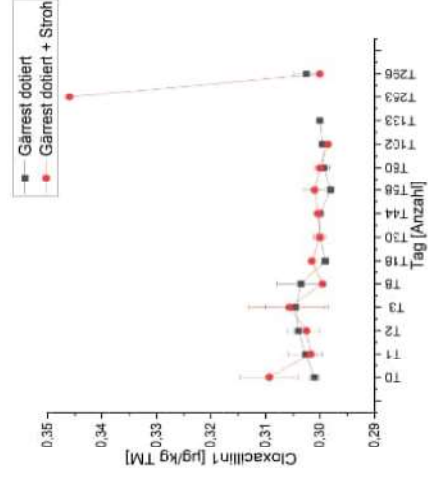
Anhang 1: Wiederfindungsraten aus Versuchen mit gespikten Proben unter Verwendung verschiedenerer SPE-Sorbensmaterialien

Substanz		C18	GR+M	SG+M	HTK+M	RG+OS	GR+OS	SG+OS	SG+OS
2-Aminoadipinsäure	µg/kg	23,78	3,37	14,73	12,85	24,55	3,63	16,18	14,33
	% WFR	118,88	16,85	73,63	64,25	122,75	18,13	80,88	71,63
6-Aminopenicillansäure	µg/kg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	% WFR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Phenoxymethylpenicillinsäure	µg/kg	7,68	9,80	0,35	1,13	9,57	12,13	7,32	1,87
	% WFR	38,40	49,00	1,76	5,66	47,84	60,63	36,61	9,33
Penicillamin	µg/kg	1,56	1,56	1,57	1,82	1,56	1,62	1,58	1,85
	% WFR	7,78	7,78	7,85	9,09	7,78	8,08	7,90	9,27
Penicillamin-Disulfid	µg/kg	24,70	19,58	18,15	18,68	24,93	18,85	18,45	15,18
	% WFR	123,50	97,88	90,75	93,38	124,63	94,25	92,25	75,88
Formylciprofloxacin	µg/kg	0,07	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	% WFR	1,43	3,45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Desethylen Ciprofloxacin	µg/kg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	% WFR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Sulfociprofloxacin	µg/kg	0,66	0,44	1,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	% WFR	13,13	8,79	27,45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Oxociprofloxacin	µg/kg	64,90	63,90	59,23	22,88	0,00	0,00	0,00	0,00
	% WFR	129,80	127,80	118,45	45,75	0,00	0,00	0,00	0,00
Penicillin G	µg/kg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	% WFR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Penicillin V	µg/kg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,43
	% WFR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	12,16

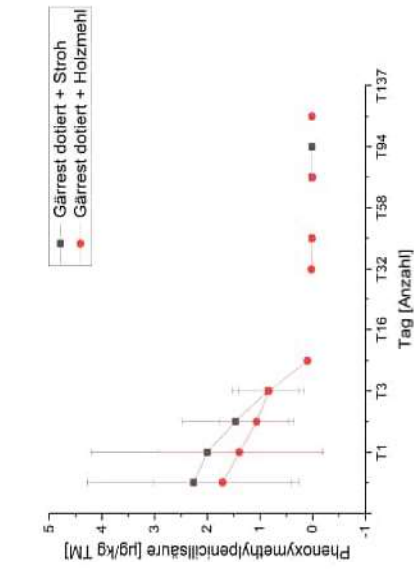
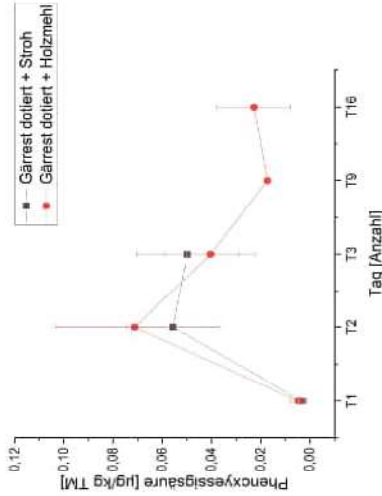
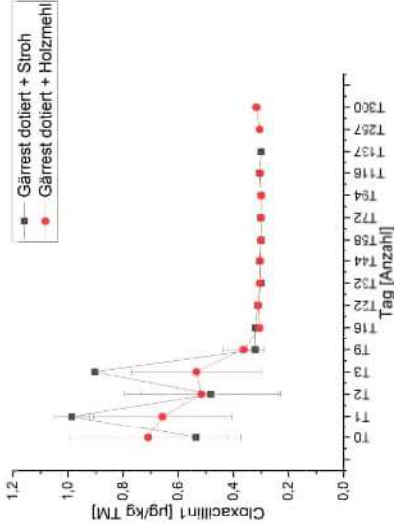
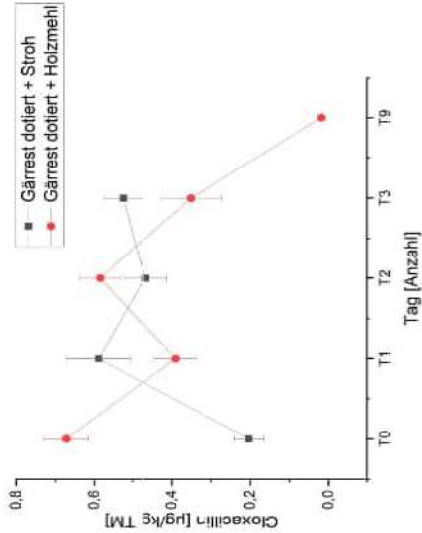
Substanz		RG+M	GR+M	SG+M	HTK+M	RG+OS	GR+OS	SG+OS	SG+OS
2-Aminoadipinsäure	µg/kg	24,15	3,51	16,63	14,80	22,65	3,86	16,65	14,30
	% WFR	120,75	17,53	83,13	74,00	113,25	19,30	83,25	71,50
6-Aminopenicillansäure	µg/kg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	% WFR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Phenoxymethylpenicillinsäure	µg/kg	0,00	0,00	0,00	0,00	4,54	5,91	4,09	0,00
	% WFR	0,00	0,00	0,00	0,00	22,69	29,56	20,46	0,00
Penicillamin	µg/kg	1,56	1,56	1,57	1,71	1,55	1,56	1,57	1,63
	% WFR	7,78	7,80	7,85	8,53	7,75	7,80	7,83	8,16
Penicillamin-Disulfid	µg/kg	19,73	17,03	16,83	15,95	18,38	20,63	17,90	16,05
	% WFR	98,63	85,13	84,13	79,75	91,88	103,13	89,50	80,25
Formylciprofloxacin	µg/kg	0,00	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	% WFR	7,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Desethylen Ciprofloxacin	µg/kg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	% WFR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Sulfociprofloxacin	µg/kg	0,21	0,16	1,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	% WFR	3,12	28,45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Oxociprofloxacin	µg/kg	47,78	74,40	64,33	21,18	0,00	0,00	0,00	0,00
	% WFR	148,80	128,65	42,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Penicillin G	µg/kg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	% WFR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Penicillin V	µg/kg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,55
	% WFR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,75
Ciprofloxacin	µg/kg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	1,35	0,53
	% WFR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	1,35	0,53
Danofloxacin	µg/kg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
	% WFR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
Marbofloxacin	µg/kg	0,00	0,00	0,00	0,00	2,48	3,16	8,99	2,21

	% WFR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,48	3,16	8,99	2,21
Norfloxacin	µg/kg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,84	0,00
	% WFR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,84	0,00
Ofloxacin	µg/kg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,57	4,93	11,23	3,43
	% WFR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,57	4,93	11,23	3,43
Amoxicillin	µg/kg	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,31	0,30	0,30	0,30
	% WFR	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,54	1,50	1,50	1,50
Ampicillin	µg/kg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	% WFR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Cloxacillin	µg/kg	0,96	0,98	0,98	0,98	0,97	0,97	3,48	2,97	3,33	52,15
	% WFR	4,81	4,91	4,92	4,92	4,85	4,85	17,40	14,84	16,64	260,75
Dicloxacillin	µg/kg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,58
	% WFR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,89
Oxacillin	µg/kg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,10	2,15	3,16	77,65
	% WFR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	15,48	10,74	15,78	388,25
Enrofloxacin	µg/kg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	% WFR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4-Hydroxyphenoxyessigsäure	µg/kg	4,63	4,38	1,58	1,58	2,01	2,01	0,00	0,00	0,00	0,00
	% WFR	23,14	21,88	7,88	7,88	10,06	10,06	0,00	0,00	0,00	0,00
Phenoxyessigsäure	µg/kg	14,83	24,23	7,29	7,29	3,88	3,88	0,00	0,00	0,00	0,00
	% WFR	74,13	121,13	36,43	36,43	19,41	19,41	0,00	0,00	0,00	0,00

Anhang 2 Ergänzende Grafiken



Parzellenversuche AGD unbepflanzt



Parzellenversuche AGD Mais

