

## Abschlussbericht

# Entwicklung und Erprobung ökologischer Maßnahmen zur Reduzierung der Bodenbelastung mit anthropogenen Spurenstoffen – Umsetzung von Erkenntnissen aus den Projekten ABIOTEC und AMEDITEC

## Kooperation AGROPrax

2023 LFE 0004

### Koordinator:

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



### Partner:

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



Dr. E.- Peter Kulle  
Projektleiter Kooperation AGROPrax  
Weimar, 16.12.2025

---



Carl Telle (M. Sc.)  
Stellv. Projektleiter Kooperation AGROPrax  
Weimar, 16.12.2025

---

## Inhalt

|                                            |    |
|--------------------------------------------|----|
| Problemstellung .....                      | 4  |
| Zielsetzung des Kooperationsvorhabens..... | 7  |
| Material und Methoden .....                | 8  |
| Ergebnisse .....                           | 23 |
| Literaturverzeichnis .....                 | 41 |
| Danksagung .....                           | 48 |

## Problemstellung

Die Stabilisierung und der Erhalt der Bodenfruchtbarkeit, nachhaltige Ressourceneffizienz, auch im Sinne eines „aktiven“ Boden- und Gewässerschutzes, sind die Basis und wirtschaftliche Grundlage eines jeden modernen Agrarbetriebes. In diesem Sinne spielen die betriebs- bzw. wirtschaftseigenen Dünger im Rahmen einer sinnvollen **Kreislaufwirtschaft** eine wesentliche Rolle. Daher handelt es sich im Projekt um Maßnahmen, die über Thüringen und Deutschland hinaus europa- und weltweit von Bedeutung sind. Ein wesentlicher Vorteil wird die Reduktion von problematischen Spurenstoffen wie beispielsweise Antibiotika im Stoffkreislauf sein. Es bestehen berechnete Erwartungen, dass derartige Prozesse und Verfahren in allen (landwirtschaftlichen) Unternehmen eingesetzt werden können. Die Anwendung in Tierzuchtbetrieben mit oder ohne Biogasanlage ist genauso denkbar, auch wenn die technischen Voraussetzungen ggf. ungünstiger sind. Aufgrund der aktuellen geopolitischen Situation ist die globale Düngemittelproduktion um 25 bis 30% gesunken. Die Düngemittelkosten haben sich bei explodierenden Energiekosten mittlerweile verdreifacht. Die effektive und umweltschonende Nutzung der betriebseigenen Wirtschaftsdünger inkl. Gärrest gewinnt damit verstärkt an Bedeutung.

Eine nachhaltige Landwirtschaft erfordert, die begrenzt verfügbaren natürlichen Ressourcen (Boden, Wasser, Nährstoffe) zu erhalten, alle Formen von Leben (Pflanze, Tier, Mensch, Kleinlebewesen, Mikroorganismen) und ökologisch wertvolle Gebiete (natürliche Wälder, Feuchtgebiete, Gebiete mit hoher Artenvielfalt) zu respektieren und Landwirten ihre wirtschaftliche Existenz zu sichern.



*Abbildung 1: Lebendiger, humoser Boden - Herzstück der Agrarbetriebe*

Eine gemeinsame Studie des Forschungsinstituts für biologischen Landbau (FiBL) mit dem Umweltbundesamt (UBA) sieht in einer Mischung aus intensiviertem Ökolandbau und einer verbindlich umweltschonenderen konventionellen Landwirtschaft den Schlüssel zum Erfolg. Dies spiegelt sich auch in der Gemeinsamen Agrarpolitik (GAP) der EU wider und ist Bestandteil der Roadmap der Europäischen Kommission in Form der Initiative *New Soil Strategy – healthy soil for a healthy life*, die auch Teil der *EU Biodiversity Strategy for 2030* ist. Der lebendige, humose Boden wird zunehmend als „Herzstück“ eines jeden Agrarbetriebes begriffen und steht seit je her im besonderen Fokus der ökologisch wirtschaftenden Betriebe. Ein intensives und ausgeprägtes Bodenleben, von dem stoffliche Schadenswirkungen oder zumindest gravierende Beeinträchtigungen ferngehalten werden sollten, ist Ausdruck der EU New Soil / Biodiversity Strategy. Diesen Ansprüchen soll sich das Projekt umfänglich stellen.

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) und das UBA formulierten im Rahmen verschiedener Studien hinsichtlich wichtiger Betriebsmittel wie Pflanzenschutz-, Dünge- aber auch Arzneimitteln unbedingte Handlungsnotwendigkeiten (*Hannappel et al. 2014; Kemper et al. 2018*).

Wie in verschiedenen Publikationen sowie während des internationalen Workshops in Weimar im Rahmen von ABIOTEC (2019) festgestellt wurde, bergen viele Spurenstoffe wie Antibiotika, deren Abbau- und Transformationsprodukte in der Umwelt ein schwer abzuschätzendes Risiko im Hinblick auf mögliche human-pathologische und ökosystemare Spätfolgen (*Thiele-Bruhn, 2003; Boxall et al., 2004; UBA, 2014; WHO, 2014; Bengtsson-Palme et al., 2015*). So können spezieübergreifende Auswirkungen in Form von Schädigungen der Nahrungsnetze niederer Organismengruppen (in Boden, Grundwasser) bis hin zum Auftreten von Resistenzen von Mikroorganismen unverkennbare Resultate des Anreicherungsprozesses derartiger Substanzen sein (*Halling-Soerensen et al., 1998; de Jong et al., 2014; Woolhouse et al., 2014*). Wasserlösliche Substanzen oder wasserlösliche Metaboliten wie z.B. aus der Gruppe der Sulfonamide wurden bereits im Grundwasser gefunden (\*UBA, 2016; \*NLWKN, 2017). Es herrscht teilweise große Verunsicherung, vorbeugende und begleitende Maßnahmen sind notwendig.

\*UBA, Umweltbundesamt (Hrsg.): *Aufklärung der Ursachen von Tierarzneimittelfunden im Grundwasser – Untersuchung eintragsgefährdeter Standorte in Norddeutschland*, Texte 54/2016, Dessau-Roßlau 2016.

\*NLWKN, Niedersächsischer Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz: *Regionaler Themenbericht, Ermittlung der Ursachen des Eintrages von Tierarzneimitteln in das oberflächennahe Grundwasser, Datenauswertung 2012 bis 2016, Reihe Grundwasser Band 29, Norden 2017.*

Biotische Wechselwirkungen mit der jeweils autochthonen Flora, neben Bakterien insbesondere auch Pilzen (vgl. Abb. 3), können vor allem bei der Verstrohung von Gärrest und Bodenbehandlung Möglichkeiten der Wirksamkeit solcher Verfahrensansätze aufzeigen (*Viji und Neelanarayanan, 2015*). Bei der Düngung und Einarbeitung von (flüssig)Wirtschaftsdünger in den Boden sollten Anteile von Stroh eine größere Rolle spielen, da dadurch die pilzliche Flora insgesamt und sog. Antagonisten wie *Trichoderma spec.* gefördert werden können. Mit der Stimulation der pilzlichen Flora können Abbauprozesse von Pharmaka eingeleitet und gefördert werden. Wesentliche Mechanismen der Bodengenesung konnten bereits aufgezeigt werden (*Zhao et al., 2016; Szpyrka et al., 2020; Jacobs et al., 2022*).



Abbildung 2: Mycorrhiza-Pilze an Pflanzenwurzel

Abbildung 3: Bodendecker im Maisanbau

Durch vertiefte und genauere Kenntnisse zu den wachstumsrelevanten Wirkungen wichtiger Gruppen von Mikroorganismen wird eine Auswahl von Indikatoren für eine Bewertung möglich. Nachfolgend aufgeführte, interessante bodenbiologische „Nebeneffekte“ aus den Projekten ABIOTEC und AMEDITEC können schließlich auch im Rahmen des angestrebten Nachfolgeprojekts noch näher betrachtet werden:

Wesentliche Bausteine der Bodengesundheit (phytosanitäres Potenzial), u.a. vermittelt durch *Antagonisten* wie *Trichoderma* spez. – im Rahmen unserer Projektansätze von ABIOTEC und AMEDITEC nachgewiesen - sind äußerst wichtige Vertreter der Bodenflora und innerhalb der Rhizosphärenpopulation. Sie interagieren zwischen Pflanze, anderen Mikroorganismen und Boden. Durch die Konkurrenz mit anderen Mikroorganismen werden sie in letzter Zeit immer öfter auch gezielt als Antagonisten zu phytopathogenen Pilzen eingesetzt. Verschiedene Strahlenpilze, Bakterien aus der Gruppe der sog. *Actinomyceten*, sind maßgeblich an der Humusbildung beteiligt und erzeugen zusammen mit Pilzen den typischen Erdgeruch. Viele Arten produzieren antibiotische Substanzen (z.B. *Chloramphenicol*, *Streptomycin* oder *Tetracycline*), die auf andere Mikroorganismen hemmend oder toxisch wirken.

Als relevante bodenbauliche Maßnahme kann in diesem Zusammenhang der Anbau von NawaRo wie Mais mit **integrierter Zwischensaat (Weiß-, Rotklee, Luzerne)** zusätzliche Wirkungen entfalten (vgl. Abb. 2): Neben einem intensiviertem Abbau von Spurenstoffen aufgrund einer erweiterten bodenbiologischen Vielfalt (u.a. Rhizosphäreneffekt) sollten auch Bodenerosion, Verunkrautung und Austrocknung reduziert, das Gleichgewicht zwischen Humusauf- und -abbau gestärkt, Boden- und Rhizosphärenbiologie (verstärkt *Actinomyceten*) sowie die natürliche N- Fixierung, aber auch die biologische Vielfalt gefördert werden können.

Mit der Stimulierung und Förderung des Bodenmikrobioms sind grundsätzlich höhere Abbauleistungen gegenüber verschiedenen Xenobiotika wie z.B. Pharmaka verbunden. Um eine direkte Verlagerung der anthropogenen Spurenstoffe in Lebensmittel- und Futtermittelpflanzen zu vermeiden und ihren Abbau in Böden via Bodenmikrobiologie zu stimulieren, bietet sich daher der Anbau von NawaRo im Rahmen der Fruchtfolgen bzw. als Zwischenfrucht an.

Damit soll erreicht werden, dass der Nachbau von Lebensmittel- und Futtermittelpflanzen spurenstofffrei und deutlich sicherer wird.

## Zielsetzung des Kooperationsvorhabens

Die übergeordnete, wesentliche Zielsetzung des Projektes ist es, den Agrarbetrieben angepasste Verfahren und Prozedere zum Abbau von Pharmakarückständen in Wirtschaftsdünger zur Verfügung zu stellen, die einfach, kostengünstig und robust und mit eigenen Kapazitäten realisierbar sind. Dabei sind erfolgversprechende Maßnahmen zu spezifizieren, zu prüfen und Einflussfaktoren zu ermitteln. Dazu ist ein Diskussionsprozess mit den Betrieben zu führen und gezielte Erprobungen sind vorzubereiten. Den Betrieben soll letztendlich eine für sie praktikable Handlungsanleitung zur Verfügung gestellt werden, wie sie nachhaltig mit Flüssigdünger, der Spuren von Pharmaka enthält und damit Pflanze, Boden und Grundwasser gefährden kann, umgehen sollten.

Während es im primären Projektteil um die laborative, versuchstechnische und messtechnische Entwicklung und Präzisierung von Messmethoden und -verfahren geht, sollen nachfolgend die erfolgversprechendsten Maßnahmen ausgewählt und selektiv umgesetzt werden mit dem Ziel eines forcierten Abbaus der Pharmaka:

### **1 Stärkung und Stabilisierung der Bodenfruchtbarkeit und -gesundheit durch gezielte Förderung von Abbauprozessen hinsichtlich Pharmaka und ihrer Metaboliten, Behandlung von flüssigem Wirtschaftsdünger und gezielte Gärrestverwertung**

- Maßnahmen vor Gärrest- Ausbringung, Verfahrensansätze und Vorversuche zu:
  - a) Gärrest- Entwässerung und Vererdung
  - b) Umwandlung von Gärrest in *Terra preta* („Schnellhumus“) vs. Kompostierung
  - c) Verstrohung von Gärrest
- Maßnahmen nach Gärrestausrückbringung, gezielte Förderung des Bodenmikrobioms (*Hyphenpilze, Actinomyceten*)
  - a) Parzellenversuche mit Wintergetreide/Raps: Gärrest mit/ohne Strohanteile
  - b) Anbau von Untersaaten/Zwischenfrüchten (Weiß-, Rotklee, Luzerne) bei Mais (als Beispielpflanze für NawaRo mit geringer Bodendeckwirkung)

### **2 Entwicklung und Aufbau eines Prüfstandes zur Simulation des Abbaus (und Leaching) von Pharmaka über Bodenprozesse**

- Aufbau der Bodenlysimeter (Labor- und kleintechnisch)
- Begleitende Sensorik für Umweltparameter (Feuchte, Temperatur)
- Erfassung von Umweltparametern für Boden und Sickerwasser

### **3 Entwicklung von analytischen Konzepten und Methoden unter Nutzung der hochauflösenden Massenspektrometrie, PCR, Metagenomik**

- Methodenentwicklung zur quantitativen Bestimmung von Fluorchinolonen unter Berücksichtigung spezifischer abbaurelevanter Metaboliten und Transformationsprodukte
- Untersuchungen des Mikrobioms
- Angepasster Toxizitätstest und Pflanzentest

### **4 Grundzüge eines Leitfadens für Betriebe zum Umgang mit Gärrest, der Rückstände von Pharmaka enthält**

- Inhalt des zukünftigen Leitfadens
- Erste Erkenntnisse und Möglichkeiten zur Überführung in die Praxis
- Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen

## Material und Methoden

### Auswahl der antibiotischen Substanzen

Aus den Antibiotikaklassen wurden im Rahmen der Durchführung der Versuche die *Fluorchinolone* als schwer abbaubare Wirkstoffe ausgewählt.

Fluorchinolone sind eine etablierte Klasse von Antibiotika, die sich in den letzten Jahrzehnten aufgrund ihres breiten Wirkspektrums großer Beliebtheit erfreuen. Sie sind sowohl gegen grampositive als auch gegen gramnegative Bakterien wirksam und werden daher vielfältig eingesetzt. Trotz der Toxizitätsprobleme einiger Vertreter dieser Arzneimittelklasse (teilweise vom Markt genommen) bleibt insbesondere Ciprofloxacin ein führendes Antibiotikum zur Behandlung von Infektionen.

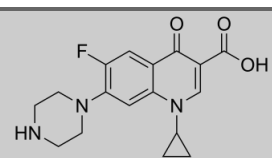
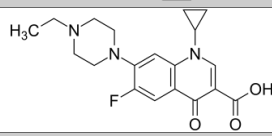
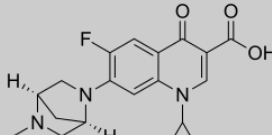
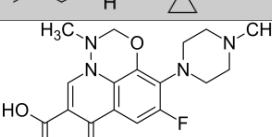
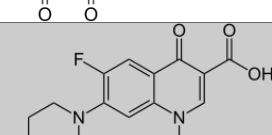
Antibakterielle Chinolon-Wirkstoffe finden häufig Anwendung in der Nutztierhaltung, Geflügelzucht und Aquakultur, sowohl zur Vorbeugung als auch zur Behandlung von Infektionskrankheiten. Die Vielzahl verfügbarer Wirkstoffe erfordert eine effiziente Analyseverfahren, um mehrere Komponenten gleichzeitig zu erfassen.

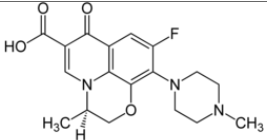
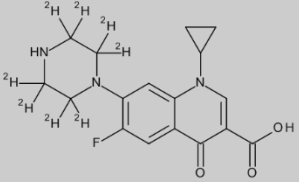
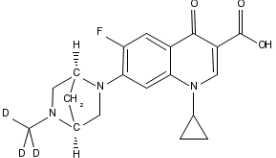
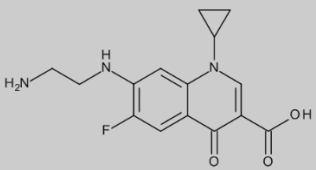
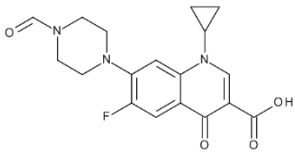
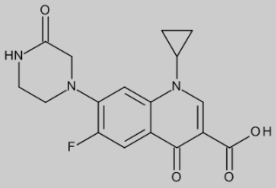
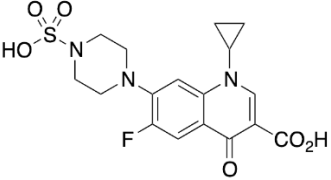
Fluorchinolone stellen besondere Herausforderungen bei der analytischen Trennung dar, die auf ihrer chemischen Struktur beruhen: Sie sind polyaromatische, basische Verbindungen mit einem Fluoratom und einer Carbonsäuregruppe, was zu zwitterionischen Eigenschaften führt. Diese einzigartige Chemie erfordert spezielle analytische Ansätze.

Die Kinetex Biphenyl-Säule (Fa. Phenomenex) hat hier eine überlegene analytische Trennung im Vergleich zu anderen UHPLC-Säulen (z. B. EVO C18, XB-C18) demonstriert. Sie ermöglicht eine schnelle, robuste und sensitive Analyse antibakterieller Chinolon-Wirkstoffe mittels HPLC-MS/MS. Angesichts des wachsenden Einsatzes dieser Substanzen ist die Entwicklung einer geeigneten reproduzierbaren HPLC-MS-Methode zur Quantifizierung dieser Arzneimittel von entscheidender Bedeutung.

Diese Anwendung demonstriert die Effizienz der Biphenyl-Säule für die schnelle und präzise Analyse der nachfolgenden Analyten.

Tabelle 1: Übersicht der im Projekt eingesetzten Fluorchinolon-Antibiotika, Metaboliten und Transformationsprodukte

| Analyt        |    | CAS         | Mol.-gew.                  | Struktur                                                                              |
|---------------|----|-------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Ciprofloxacin | OS | 85721-33-1  | 331,34 g·mol <sup>-1</sup> |  |
| Enrofloxacin  | OS | 93106-60-6  | 359,39 g·mol <sup>-1</sup> |  |
| Danofloxacin  | OS | 112398-08-0 | 357,39 g·mol <sup>-1</sup> |  |
| Marbofloxacin | OS | 115550-35-1 | 362,36 g·mol <sup>-1</sup> |  |
| Norfloxacin   | OS | 70458-96-7  | 319,33 g·mol <sup>-1</sup> |  |

|                                 |      |                   |                            |                                                                                       |
|---------------------------------|------|-------------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Ofloxacin</b>                | OS   | 82419-36-1        | 361,37 g·mol <sup>-1</sup> |    |
| <b>D8-Ciprofloxacin</b>         | IS   | 130050-35-9       | 339,39 g·mol <sup>-1</sup> |    |
| <b>D3-Danofloxacin</b>          | IS   | 1217683-55-0      | 360,41 g·mol <sup>-1</sup> |    |
| <b>Desethyleneciprofloxacin</b> | M/TP | 528851-31-2 (HCl) | 305,31 g·mol <sup>-1</sup> |    |
| <b>Formyl-Ciprofloxacin</b>     | M/TP | 93594-39-9        | 359,35 g·mol <sup>-1</sup> |   |
| <b>Oxociprofloxacin</b>         | M/TP | 103237-52-1       | 345,33 g·mol <sup>-1</sup> |  |
| <b>Sulfociprofloxacin</b>       | M/TP | 105093-21-8       | 411,40 g·mol <sup>-1</sup> |  |

# **1 Stärkung und Stabilisierung der Bodenfruchtbarkeit und -gesundheit durch gezielte Förderung von Abbauprozessen hinsichtlich Pharmaka und ihrer Metaboliten, Behandlung von flüssigem Wirtschaftsdünger und gezielte Gärrestverwertung**

## **1.1 Ansatz und Durchführung von kleintechnischen und Feldversuchen**

Ein grundlegender Projektinhalt war die Vorbereitung und partielle Durchführung von praxisnahen Versuchsaufbauten mit hohem Anwendungsbezug zur Erprobung der verfahrenstechnischen Ansätze zu Abbau- und Umwandlungsprozessen antibiotischer Veterinärpharmaka mit Blick auf das Nachfolgeprojekt. Zusätzlich sollten Untersuchungen zu Auswirkungen von Abbau- und Transformationsprodukten auf das Bodenmikrobiom angestellt werden. Hierzu wurden zwei Arten von verfahrenstechnischen Ansätzen in anwendungsnahen Versuchsreihen durchgeführt: einerseits Parzellenversuche unter Realbedingungen in Zusammenarbeit mit den landwirtschaftlichen Betrieben inkl. Beprobung und im kleintechnischen Maßstab unter standardisierten Bedingungen in Reaktionsgefäßen.

### **a) Gärrest- Entwässerung und Vererdung inkl. Verstrohung**

Die Entwässerung von Gärrest und einhergehende Vererdung sollten für das Nachfolgeprojekt näher erprobt und betrachtet werden. Zwei Kunststoffbehälter (Boden gelocht; max. Füllvolumen ca. 500 L) wurden mit Gärrest AGD (ohne Antibiotikazusatz) befüllt, wobei der Boden mit je 10 cm Stroh bedeckt wurde (Abb. ...). Während der Behälter ohne Zuschläge mit 450 L GR beaufschlagt wurde, konnte der zweite Behälter mit 390 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 4: Halbtechnische Anlage zur Gärrestvererdung bzw. -verstrohung



Abbildung 5: Halbtechnische Anlage zur Gärrest- Vererdung bzw. Verstrohung nach Befüllung ohne Zuschläge (links) bzw. mit Zuschlägen (rechts)

### b) Umwandlung von Gärrest in *Terra preta* („Schnellhumus“) vs. Kompostierung

Der Ansatz in den Reaktionsgefäßen zur Gärrest-Terra Preta-Umwandlung erfolgte unter dem Gesichtspunkt der Methodenentwicklung analog den Feldversuchen, jedoch unter Bedingungen mit höherer Standardisierung (bei 20 – 25 °C Temperatur). Durch die Normalisierung abiotischer Faktoren wie Temperatur, Feuchte und Ansatzvolumen lassen sich Änderungen im Bereich biotischer Parameter deutlicher nachvollziehen. Für die Herstellung der Terra Preta im kleintechnischen Maßstab wurden folgende Materialien verwendet: pro 30 L Maischefass, Angaben in [kg] bzw. [L]

| Material               | Variante I | Variante II |
|------------------------|------------|-------------|
| Bentonit               | 1,0        | 0,7         |
| Gesteinsmehl           | 1,0        | 0,7         |
| Biokohle               | 2,0        | 1,5         |
| Gärrest                | 20 L       | 22 L        |
| Sägespäne              | 0,5        | 0,5         |
| Silage                 | 3,5        | -           |
| Weizenkleie            | 0,2        | 0,1         |
| Melasse/Kanne Brottunk | 3 L        | 3,5 L       |



Abbildung 6: Maischefässer mit Terra Preta Mischansätzen I und II (links), 80L-Behälter Kompostierungsversuch (rechts)

Für die Herstellung von **Gärrest-Kompost** (ohne Antibiotikazusatz) wurden im 80 L-Reaktionsgefäß 20 L Gärrest mit Strohhäcksel bis zu einem Feuchtegehalt von 55% versetzt.

In zusätzlichen 10L Kleingefäßen wurde eine Variante 1 zuvor ohne weitere Zuschläge und Variante 2 mit Zuschlägen (je 1 L Kompost und 1 L Steinmehl) beaufschlagt.

## 1.2 Maßnahmen nach Gärrest- Ausbringung, Gezielte Förderung des Boden- Mikrobioms

### a) Parzellenversuche mit Wintergetreide: Gärrest mit bzw. ohne Strohanteile

Am Rande eines Winterweizenschlages wurden drei Parzellen mit einer Fläche von je 1,5m<sup>2</sup> angelegt. Dabei wurde eine Parzelle mit 15 L Gärrest und anschließend 10 L Hanfstroh (links; aus Heimtierbedarf), die mittlere Parzelle mit 2 L Hanfstroh, eingerührt in 15 L Gärrest und eine Parzelle ohne Stroh mit 15 L Gärrest beaufschlagt (rechts; Abb. 7).



Abbildung 7: Parzellen mit Gärrestbeaufschlagung mit und ohne Strohanteilen

### b) Anbau von Untersaaten / Zwischenfrüchten (Luzerne) bei Mais - Beispielkultur für NawaRo mit geringer Bodendeckerwirkung

Die Übertragung und Anwendung der Erkenntnisse aus den labortechnischen Versuchsaufbauten erfolgte in Kooperation mit dem Agrarbetrieb 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 Versuchspartellen an beiden Standorten erprobt (Abb. 8).



Abbildung 8: Mais- Parzellen mit und ohne Antibiotika- dotierter Gärrestbeaufschlagung mit (rechts) und ohne (links) Luzerneuntersaat; Kontrollparzelle (Mitte) zur Hälfte mit Luzerneuntersaat

Zum Ansetzen von dotiertem Gärrest wurden auf die Trockenmasse bezogene Mengen von Referenzstandards eingewogen und in 1000 mL Lösungsmittel-Wassergemisch (DMSO:H<sub>2</sub>O 8:2) gelöst. Die eingesetzten Substanzen *Ciprofloxacin*, *Danofloxacin*, *Enrofloxacin*, *Marbofloxacin*, *Norfloxacin*, *Ofloxacin* wurden dabei mit einer Konzentration von 30 µg/kg TM dotiert.

Zum Ansetzen des dotierten Gärrest wurden zunächst die relative Feuchte bzw. die Trockenmasse bestimmt. Hierzu wurde mittels Feuchtwage geprüft, um anhand der Trockenmasse (TM) eine definierte Bezugsgröße zur Berechnung der Standardeinwaagen und damit auch ausgebrachten Mengen der verschiedenen Antibiotika zu erhalten. Um eine Zielkonzentration von 30 µg/kg TM einzustellen, wurden Referenzstandards der Antibiotika in einem Ansatz eingewogen und kurz vor Zugabe zur Düngermatrix in einem Lösungsmittel-Wasser-gemisch (DMSO:RW 8:2) gelöst und anschließend unter kontinuierlichem Rühren dem Spikeansatz zugegeben. Zu einem Dotieransatz (30 L) wurde somit 1 L Dotierlösung beigemischt. Aufgrund der Verfügbarkeit im Agrarbetrieb wurde der Gärrestansatz erstellt. Der GR-Ansatz wurde unmittelbar im Anschluss zur Beaufschlagung der Feldparzellen verwendet. Über den gesamten Zeitraum der 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 Probenahme erfolgte im Verlauf der Versuchsreihe zu Beginn engmaschig und wurde mit zunehmendem Verlauf in größeren Intervallen durchgeführt. Die auf diese Weise erhaltenen Proben wurden nach dem etablierten 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 Messungen bzw. Bilanzierungen der gebildeten Umwandlungsprodukte können den Abbildungen im Ergebnisteil entnommen werden.

Über einen Versuchszeitraum von insgesamt 149 Tagen wurden Proben zur chemischen Analytik sowie mikro- und molekularbiologischen Untersuchung entnommen.

Zusätzlich wurden Proben verwendet, um mittels Next-Generation-Sequencing (NGS) 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 zu entnehmen.

## 2 Entwicklung und Aufbau eines Prüfstandes zur Simulation des Abbaus (und Leaching) von Pharmaka über Bodenprozesse

Ein grundlegendes Ziel bestand in der Vorbereitung und partiellen Durchführung von praxisnahen Versuchen inkl. Vorbereitung der begleitenden Analytik zur Erprobung und Testung von Versuchsansätzen.

### 2.1 Bodenlysimeter (Labor- und kleintechnisch)

### 2.2 Begleitende Sensorik für Umweltparameter (Feuchte, Temperatur)



Abbildung 9: Perkolatorversuche im Labormaßstab mit Versuchssperipherie (Bewässerung, Sensorik)

#### *Bodenfeuchte*

Die Bodenfeuchte wird mittels Kapazitiver Hygrometer vom Typ ‚Bodenfeuchtesensor Hygrometer Modul V1.2‘ genutzt. Um diese für den Einsatz in verschiedenen Bodentiefen nutzbar zu machen, wurde der obere Teil in einen dafür 3D-gedruckten Sensorkopf montiert und mit Elektronik-Dichtmasse wasserfest vergossen.

Da der Feuchtesensor ein analoges Messsignal zwischen Null und fünf Volt ausgibt, muss das Messsignal umgeformt und kalibriert werden. Das Analogsignal wird via Analog Digital Wandler (ADC) in ein digitales 10-Bit-Signal umgewandelt und auf den jeweiligen Boden justiert.

Zur Kalibrierung wurde jeder Sensor einer 6-Punkt-Kalibrierung (20 % Schritte, von 0% bis 100%), unterzogen und auf den jeweiligen Bodentypen kalibriert. Dies muss im Vorhinein passieren, da die unterschiedlichen Bodenarten eine unterschiedliche Wassersättigung aufweisen. Die variierende Sättigung resultiert vor allem aus Korngröße und Kapillareffekten sowie dem Verdichtungsgrad des Bodens.

#### *Bodentemperatur*

Die Bodentemperatur wurde mit Hilfe von digitalen ‚DS18B20-Edelstahl-Temperatursensoren‘ gemessen. Der größte Vorteil dieser Sensoren besteht darin, dass sie schon für den Einsatz im Außenbereich konstruiert sind und sich bei verschiedensten Anwendungen bewährt haben. Zudem ist ihr Datensignal bereits digital, sodass nur ein Funktionstest durchgeführt wurde, da die Temperaturmessung Mediums-unabhängig ist.

### *Perkulatorversuche*

Pro Perkulator wurden Bodenfeuchte und Bodentemperatur an drei definierten Punkten (Bodentiefen) gemessen. Jeder Perkulator wurde mit einem eigenen Arduino ausgelesen, um mögliche Ausfälle in der Testphase zu kompensieren. Beim Programmieren der Arduinos wurden alle auf eine einheitliche ‚Unix time‘ synchronisiert. Alle 30 Sekunden wird ein Datensatz erzeugt und auf einem Speichermedium gesichert. Die gesammelten Messungen wurden messtäglich ausgelesen, um die Daten für die weiter Verwertung zu sichern.

Im labortechnischen Maßstab wurden variierende Bodenmatrices sowie dotierte Gärrestansätze eingesetzt und für die Validierung der Sensorik mit unterschiedlichen Feuchtigkeitsmengen beladen. Die Dosierung der Flüssigkeit erfolgte automatisiert über eine Peristaltikpumpe in Form von Tröpfchenbewässerung zur Simulation von Niederschlagsereignissen. Die tatsächliche Flüssigkeitsaufnahme wurde dabei durch gravimetrische Messung überwacht. Über einen Hahnanschluss an der Auslassseite wurde der ‚Runoff‘ messtäglich aufgefangen und auf ‚Leaching‘ der dotierten Antibiotika zur weiteren Analyse beprobt. Der gesamte Aufbau ermöglicht somit die Simulation von Umwelteinflüssen auf dotierte Bodensysteme sowie die sensorische und analytische Bewertung von Verbleib und Verdriftung der Analyten.

### *Lysimeter*

Im kleintechnischen Lysimeterprüfstand kommen für Temperatur und Feuchtemessung dieselben Sensoren zum Einsatz. Zur Datenaufzeichnung wird hier anstatt eines Arduinos ein Raspberry Pi 4 eingesetzt. Der Temperatursensor wird entsprechend wie beim Arduino direkt über den digitalen Kanal gesteuert und ausgelesen. Da der Raspberry Pi 4 nicht über einen integrierten ADC verfügt, wird hier das Signal von den Feuchtesensoren via Analog-Digital-Wandler vom Typ ‚ADS1115‘ verarbeitet und als digitales Signal an den Raspberry Pi 4 übergeben, um es dann dort weiter zu verarbeiten. Die Daten können so über Intranet online ausgelesen oder direkt verarbeitet und prozessiert werden.



Abbildung 10: Versuchsaufbau Lysimeterprüfstand im kleintechnischen Maßstab

### 2.3 Erfassung von Umweltparametern für Boden und Sickerwasser

Um eine lokale Messung relevanter meteorologischer Größen (Temperatur, Luftfeuchte, Niederschlag) durchzuführen, wurde auf einen digitalen meteorologischen Messwertgeber (Fa. Ahlborn, Typ ALMEMO D7) zurückgegriffen. Dieser liefert eine ganzjährige Aufzeichnung der Wetterlage und bietet somit die Möglichkeit die Einwirkungen auf den Prüfstand zu rekapitulieren.

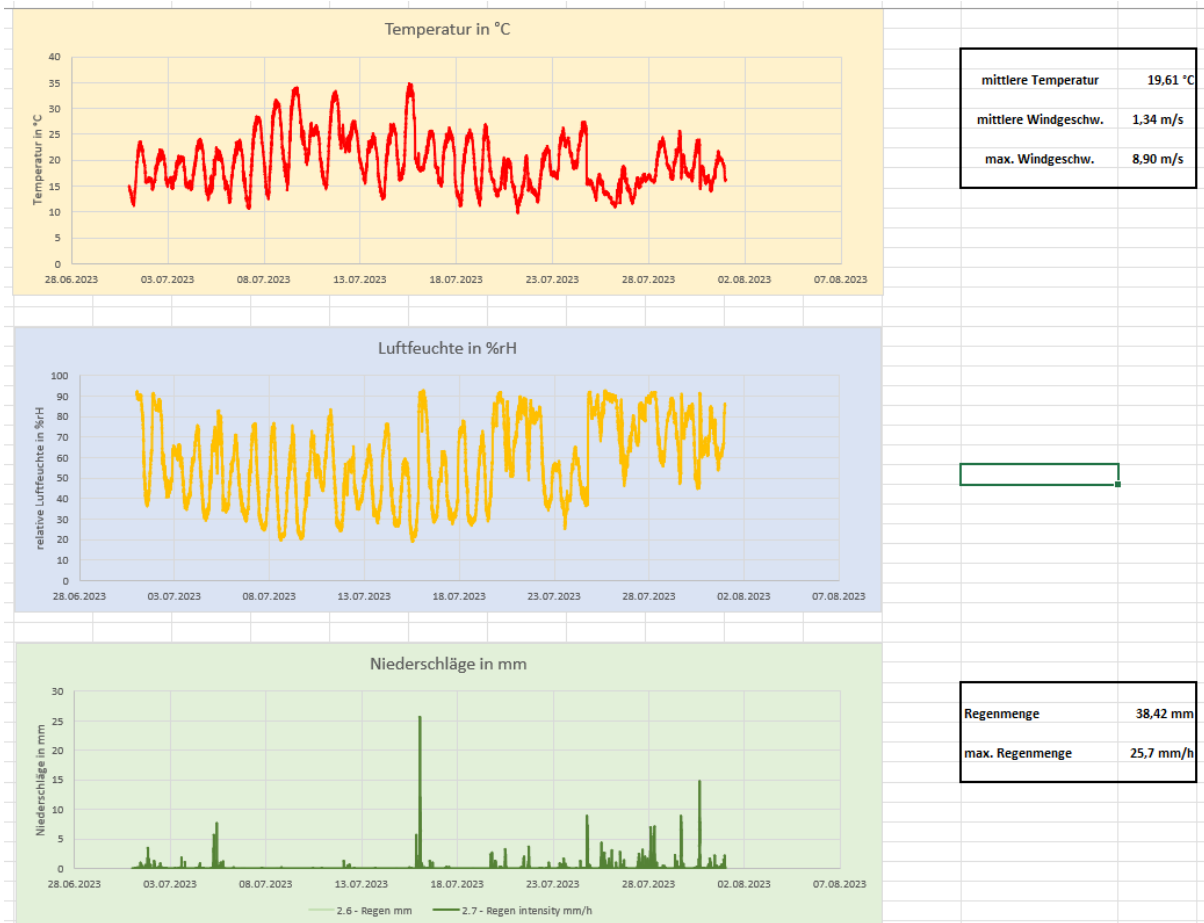


Abbildung 11: Aufbereitete Ausgabe der gemessenen Umweltparameter

### 3 Entwicklung von analytischen Konzepten und Methoden unter Nutzung der hochauflösenden Massenspektrometrie, PCR, Metagenomik

#### 3.1 Methodenentwicklung zur quantitativen Bestimmung von Fluorchinolonen unter Berücksichtigung spezifischer abbaurelevanter Metaboliten und Transformationsprodukte

##### Extraktionsmethode für die Bestimmung von Fluorchinolonen in Bodenproben

Im ersten Schritt der Probenvorbereitung: werden die Bodenproben gefriergetrocknet und gemahlen. Anschließend werden 1,0 g Trockenmasse ( $\pm 0,1$  g) der Probe als Doppelbestimmung in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit internen Standards ( $D_3$ -Danofloxacin,  $D_8$ -Ciprofloxacin,  $c = 100$  ng/mL) versetzt. Zur Extraktion werden 10 ml eines Gemischs aus  $Na_2EDTA$ -Mcllvaine-Puffer (pH 4) und Acetonitril (1:4, v/v) zugegeben. Anschließend werden 0,8 g wasserfreies Natriumsulfat ( $Na_2SO_4$ ) und 0,2 g Natriumchlorid (NaCl) hinzugefügt. Die Probe wird für 10 Minuten gevortext und 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt, gefolgt von einer Zentrifugation bei 4000 U/min für 10 Minuten.

Im nächsten Schritt der Aufreinigung werden 1,5 ml des Überstands in ein 2-ml-Zentrifugenröhrchen überführt, das 25 mg C18-Sorbens und 50 mg wasserfreies  $Na_2SO_4$  enthält. Nach 5-minütigem Vortexen wird die Probe bei 8000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Zur Aufkonzentrierung in Vorbereitung der Messung wird 1 ml des gereinigten Extrakts unter Stickstoffstrom eingeeengt und der Rückstand in 1 ml eines Eluenten-Gemischs (0,1 % Ameisensäure in Wasser/Acetonitril, 94:6, v/v) aufgenommen. Nach Filtration durch eine 0,22- $\mu m$ -Membran wird die Probe in ein Autosampler-Vial überführt und mittels HPLC-MS/MS analysiert.

Die Validierung der Methode zeigt gute Wiederfindungsraten (55–108 %), niedrige Nachweisgrenzen (0,09–0,68  $\mu g/kg$ ) und eine hohe Präzision ( $RSD < 20$  %). Die optimierten Bedingungen ermöglichen eine effiziente und zuverlässige Bestimmung der Fluorchinolone sowie ausgewählter Metabolite und Transformationsprodukte in landwirtschaftlichen Böden.

Aufgrund der physiko-chemischen Eigenschaften der gewählten Analyten wurde ein chromatographisches Trennverfahren eingesetzt, welches mit einer spezifischen Beschaffenheit diesen Attributen Rechnung trägt. Mittels einer Biphenylphase (Phenomenex Kinetex Biphenyl) wurde das komplexe Trennproblem in heterogenen Bodenmatrices hinreichend gut bewältigt. Dies stellt gerade bei der Untersuchung von sehr kleinen polaren Molekülen wie Metaboliten und Transformationsprodukten einen Vorteil gegenüber der klassischen Reversed-Phase (Vgl. Kinetex XB-C18, EVO C18) dar. Zur Auswahl der geeigneten stationären Phase und Etablierung eines HPLC-Gradientenprogramms mit angepassten Eluenten wurden zahlreiche Testmessungen mit Referenzstandardmessungen durchgeführt und eine optimierte Methode entwickelt.

*Tabelle 2: Übersicht der chromatographischen Methode und Messungsparameter*

|                                                                  |                                     |
|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Thermo Scientific Ultimate 3000 (LPG-3400SD, WPS-3000, TCC-3100) |                                     |
| Sciex API 4000 (Analyst 1.6.3)                                   |                                     |
| Phenomenex Kinetex Biphenyl 2.6 $\mu m$ 50x2.1mm                 |                                     |
|                                                                  |                                     |
| Eluent A: 0,1% Ameisensäure in $H_2O$ , pH 3,0                   | Eluent B: 0,1% Ameisensäure in MeOH |
| $T_c = 25$ °C                                                    | IV = 5 $\mu L$                      |

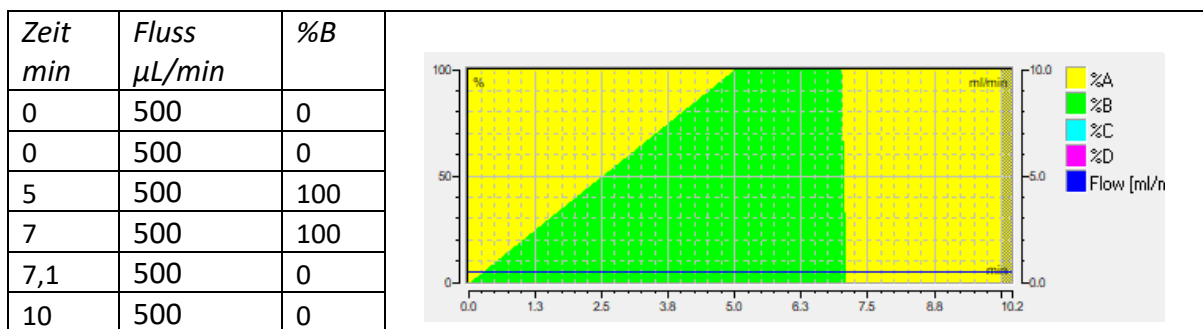


Tabelle 3: Parameter der chromatographischen Methodenentwicklung

| Bezeichnung                                    | RT   | R <sup>2</sup> | LOQ μg/L |
|------------------------------------------------|------|----------------|----------|
| 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      |
| 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     |
| Enrofloxacin                                   | 4,49 | 0,9938         | 0,01     |
| RT – Retentionszeit                            |      |                |          |
| R <sup>2</sup> - Bestimmtheitsmaß Kalibrierung |      |                |          |
| LOQ - Bestimmungsgrenze                        |      |                |          |

Tabelle 4: Massenübergänge der MRM-Messung der untersuchten Analyten

| Analyt                            | ESI +/- | Precursor-Ion |   | Produkt-Ion |
|-----------------------------------|---------|---------------|---|-------------|
| Fluorchinolone, inkl. Metaboliten |         |               |   |             |
| Ciprofloxacin                     | +       | 331,944       | → | 231         |
|                                   |         |               | → | 288         |
| Danofloxacin                      | +       | 357,831       | → | 340,1       |
|                                   |         |               | → | 254,9       |
| Marbofloxacin                     | +       | 362,966       | → | 72          |
|                                   |         |               | → | 320         |
| Norfloxacin                       | +       | 320,124       | → | 302         |
|                                   |         |               | → | 276         |
| Ofloxacin                         | +       | 361,555       | → | 318         |
|                                   |         |               | → | 261         |
| Enrofloxacin                      | +       | 360,13        | → | 316,1       |
|                                   |         |               | → | 244,9       |
| Formylciprofloxacin               | +       | 360,076       | → | 215         |
|                                   |         |               | → | 243         |
| Desethylen Ciprofloxacin          | +       | 306,143       | → | 288         |
|                                   |         |               | → | 216,9       |
| Sulfociprofloxacin                | +       | 412,966       | → | 334,9       |
|                                   |         |               | → | 257         |

|                               |   |         |   |       |
|-------------------------------|---|---------|---|-------|
| Oxociprofloxacin              | + | 346,074 | → | 326   |
|                               |   |         | → | 240,1 |
| Interne Standards             |   |         |   |       |
| D <sub>3</sub> -Danofloxacin  | + | 361,004 | → | 322   |
|                               |   |         | → | 296   |
| D <sub>8</sub> -Ciprofloxacin | + | 340,094 | → | 343,1 |
|                               |   |         | → | 85,1  |



Abbildung 12: Chromatogramm der MRM-Messmethode

### 3.2 Untersuchungen des Bodenmikrobioms

#### *Probenahme und DNA-Extraktion*

Die Entnahme der landwirtschaftlichen Bodenproben erfolgte an definierten Standorten der Parzellenversuche, um eine repräsentative Erfassung der mikrobiellen Gemeinschaft zu gewährleisten. Die Proben wurden gekühlt gelagert, bis sie weiterverarbeitet wurden. Die Extraktion der mikrobiellen Gesamt-DNA erfolgte unter Verwendung und Evaluierung verschiedener kommerzieller Kits (**DNeasy PowerSoil Pro Kit**, Qiagen; **GeneMatrix Soil DNA**, EURx; **RotiPrep Soil DNA**, Carl Roth; **RotiPrep gDNA 2.0**, Carl Roth). Diese sind teilweise speziell für die Isolierung hochmolekularer DNA aus komplexen Bodenmatrices optimiert. Die Qualität und Quantität der extrahierten DNA wurde photometrisch (Implen NP80 Microvolumenphotometer) und fluorometrisch (Promega Quantus) bestimmt, um eine ausreichende Konzentration und Reinheit für die Sequenzierung zu gewährleisten.

#### *Bibliothekspräparation für die Oxford Nanopore Sequenzierung*

Die DNA-Bibliotheken wurden unter Verwendung des **Oxford Nanopore Ligation Sequencing Kits (SQK-LSK114)** und **Rapid Sequencing DNA Kits V14 (SQK-RBK114.24)** vorbereitet. Dabei wurden folgende Schritte durchgeführt:

1. **Fragmentierung und Endreparatur:** Die DNA wurde auf eine optimale Fragmentlänge (ca. 10–20 kb) gebracht und die Enden repariert, um eine effiziente Adapterligation zu ermöglichen.
2. **Adapterligation:** Sequenzieradapter wurden an die DNA-Fragmente ligiert, um die Bindung an die Nanoporen zu ermöglichen.
3. **Reinigung:** Die Bibliotheken wurden mit magnetischen Beads (z. B. **AMPure XP Beads**) gereinigt, um nicht ligierte Adapter und Enzyme zu entfernen.
4. **Qualitätskontrolle:** Die Bibliotheken wurden mittels **Photometrie, Fluorimetrie und Gelelektrophorese** auf Fragmentlänge und Konzentration überprüft.

#### *Sequenzierung mit der Oxford Nanopore Plattform*

Die Sequenzierung erfolgte auf einem *Oxford Nanopore MinION* unter Verwendung von Flow Cells (R10.4.1), die für hohe Genauigkeit und lange Read-Längen optimiert sind. Die Sequenzierungsdauer betrug in der Regel 24–48 Stunden, um eine ausreichende Abdeckung der mikrobiellen Diversität zu erreichen. Die Echtzeit-Datenakquisition erfolgte über die *MinKNOW-Software*, die eine sofortige Überwachung der Sequenzierungsqualität ermöglichte.

#### *Bioinformatische Auswertung*

Die generierten Rohdaten (FAST5-Dateien) wurden mit der ‚Guppy-Basecalling-Algorithmus‘ (Oxford Nanopore) in FASTQ-Dateien umgewandelt. Anschließend erfolgte eine Qualitätskontrolle und Filterung der Reads mit *Porechop* (Entfernung von Adaptersequenzen) und *Filtlong* (Selektierung hochwertiger Reads). Für die taxonomische Klassifizierung und Analyse der mikrobiellen Diversität wurden die Reads mit *Kaiju* gegen eine Referenzdatenbank (*NCBI nr-Datenbank*) klassifiziert, um die taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft zu bestimmen.

### *Kaiju-Workflow zur Auswertung von Sequenzierdaten*

Kaiju ist ein Werkzeug zur taxonomischen Klassifizierung von Metagenom-Daten auf Protein-Ebene. Es ermöglicht die schnelle und sensitive Zuordnung von Sequenzierungsdaten zu Taxa (z.B. Arten, Gattungen, Familien) mithilfe von Referenzdatenbanken.

Bei den untersuchten Bibliotheken (Barcodes) handelt es sich um Extrakte von Probenmischungen aus Ackerboden der Versuchspartzen versetzt mit undotiertem Gärrest und Stroh. Es wurden dabei stets Doppelbestimmung und Doppeldurchführung durchgeführt. Hier soll beispielhaft eine undotierte (FQ-freie) Probe (Blank) dargestellt werden, damit der Einfluss der eingesetzten Antibiotika auf das Bodenmikrobiom im nächsten Schritt vergleichend gegenübergestellt werden kann. Nach der Vorbereitung der Daten (Aufbereitung der Input-Daten) erfolgt die Auswahl geeigneter Referenzdatenbanken. Kaiju nutzt Protein-Referenzdatenbanken wie NCBI RefSeq, nr, oder spezifischere Datenbanken für Viren, Pilze oder Plasmide. Die Auswahl der Datenbank hängt von der Forschungsfrage ab. Im Anschluss erfolgt die Klassifizierung der Reads. Dazu wird zunächst eine Übersetzung in Aminosäuresequenzen aus den Nukleotid-Reads prozessiert. Die übersetzten Sequenzen werden gegen die Referenzdatenbank gesucht, wobei Kaiju Maximum Exact Matches (MEMs) findet. Dies ermöglicht eine sensitive Klassifizierung. Somit ist eine Zuordnung zu Taxa möglich. Jeder Read wird dem besten Treffer in der Datenbank zugeordnet, wobei verschiedene Modi (z.B. *greedy* oder *mem*) genutzt werden können. Die Ergebnisse werden in taxonomischen Ebenen (Phylum, Klasse, Ordnung, Familie, Gattung, Art) zusammengefasst. Die bereitgestellten Plots zeigen die Verteilung der klassifizierten Reads auf diesen Ebenen für die Barcodes.

### **3.3 Angepasster Toxizitätstest: Pflanzentest**

Für im Folgeprojekt weitergehende Untersuchungen wurde ein angepasster Pflanzentest gewählt, der bei der Qualitätsbestimmung von Komposten in leicht abgewandelter Form Anwendung findet (vgl. Abb. ...). Die Methode wurde in Anlehnung an die DIN EN 16086-2:2012-01 „Bestimmung der Pflanzenverträglichkeit“ durchgeführt, womit ein wichtiges Kriterium der Qualität von Komposten ermittelt werden kann. Dabei wurde Samen von Kresse, Weizen und Gerste in einem klassischen Bio-Pflanzsubstrat (Garten DEHNER) mit 5, 10 bzw. 20% Anteil Gärrestanteil verwendet, wobei die Kontrollen undotierten Gärrest im Vergleich zu dotiertem Gärrest in den Prüfvarianten (Fluorchinolongemisch analog den Mais-Parzellenversuchen) enthielten.



Pflanzenverträglichkeitstest von Gärrest  
(undotiert)  
Pflanzsubstratgemisch mit 5, 10 bzw. 20%  
Gärrestanteil:  
Kontrollansatz:  
Gerste (links), Weizen (Mitte), Kresse (rechts)



Pflanzenverträglichkeitstest von Gärrest  
(dotiert)  
Pflanzsubstratgemisch mit 5, 10 bzw. 20%  
Gärrestanteil:  
Prüfansatz mit Fluorchinolon-Dotierung:  
Gerste (links), Weizen(Mitte), Kresse (rechts)

#### **4 Grundzüge eines Leitfadens für Betriebe zum Umgang mit Gärrest, der Rückstände von Pharmaka enthält: Basis**

Der Leitfaden für Betriebe zum Umgang mit Gärrest, der Rückstände von Pharmaka enthält, ist in einer gesonderten Datei abgelegt (ggf. ANHANG).

Erste wesentliche Erkenntnisse und Möglichkeiten zu ihrer Überführung in die Praxis sind bereits im aktuellen Leitfaden zusammengefasst.

Abschließende Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen zu Verfahrensansätzen im Hinblick auf einen (gezielten) Abbau von Pharmaka in Wirtschaftsdünger werden zur Diskussion gestellt.

## Ergebnisse

### Auswahl antibiotischer Substanzen

Die in *Tabelle 1* aufgelisteten Wirkstoffe wurden als typische praxisrelevante Vertreter der Wirkstoffklasse Fluorchinolone inkl. ihrer Metaboliten unter den Aspekten der Abbaubarkeit (und Beschaffungskosten) ausgewählt. Die Wirkstoffe der Fluorchinolone repräsentieren schwer abbaubare Substanzen und wurden in den verwendeten Dotierlösungen eingesetzt. Der Nachweis einzelner Metaboliten diente sowohl dem Verständnis als auch der näheren Beschreibung der Abbauprozesse.

### 1 **Stärkung und Stabilisierung der Bodenfruchtbarkeit und –gesundheit durch gezielte Förderung von Abbauprozessen hinsichtlich Pharmaka und ihrer Metaboliten, Behandlung von flüssigem Wirtschaftsdünger und gezielte Gärrestverwertung - Verfahrenstechnik - Verfahrensentwicklung und Abbauprozesse**

#### 1.1 **Ansatz und Durchführung von kleintechnischen und Feldversuchen**

##### a) **Entwässerungs- und Vererdungsversuche inkl. Verstrohung (c)**



Halbtechnische Anlage zur Gärrestvererdung bzw. -verstrohung nach Befüllung ohne Zuschläge nach 10 Monaten



Halbtechnische Anlage zur Gärrestvererdung bzw. -verstrohung nach Befüllung mit Zuschlägen nach 10 Monaten

Die Versuche zur Entwässerung von Gärrest zeigten nach 10 Monaten bereits eine erhebliche Reduzierung der Volumina, wobei die entstehenden Sickerwassermengen insgesamt sehr gering ausfielen ( $< 1 \text{ L}$ ). Der Gärrest mit Zuschlägen zeigte dabei auffallend weniger Sickerwasser als der Gärrest ohne Beimengungen (Vgl. *Abb.*). 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.

Weitere, insbesondere auch stoffliche Betrachtungen sind Bestandteil fortlaufender Untersuchungen. Ziel muss dabei 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/Entwässerung und Verstrohung könnten den Landwirten zusätzliche Ausbringoptionen im Rahmen der seit 2017 enger gefassten Düngemittelverordnung ermöglichen: dabei einhergehende qualitative Verbesserung des Substrates hin zu einem höherwertigen Feststoffdünger mit Nährstoffstabilisierung.

### **b) Umwandlung von Gärrest in *Terra preta* („Schnellhumus“) vs. Kompostierung**

Sowohl die *Terra preta*-Schnellhumusherstellung als auch die Kompostierung sind methodisch in maßstabsvergrößernder Weise umsetzbar. Dabei erwiesen sich die Mischungsansätze als geeignet, wobei die *Terra preta*-Variante mit Silageanteil als die günstigere bzw. effektivere eingeschätzt werden muss. In laufenden Dauerversuchen mit dotiertem Gärrest sind beide verfahrenstechnischen Varianten praktikabel als praktikabel zu bewerten und werden hinsichtlich Antibiotikaabbau geprüft.

### **1.2 Maßnahmen nach Gärrestausbringung, gezielte Förderung des Bodenmikrobioms (Hyphenpilze, Actinomyceten)**

#### **a) Parzellenversuche mit Wintergetreide: Gärrest mit bzw. ohne Strohanteile**



Abbildung 13: Parzellen mit Gärrestbeaufschlagung mit und ohne Strohanteilen nach drei Wochen

Zur Validierung der Parzellenversuche ist eine Übertragung in den halbtechnischen Lysimeterprüfstand notwendig, um unter kontrollierten Realbedingungen in praxisnaher Umgebung Änderungen der Abbauleistung systematisch überprüfen zu können und gleichzeitig Optimierungen *in situ* vorzunehmen.

#### **b) Anbau von Untersaaten / Zwischenfrüchten (Weiß-, Rotklee, Luzerne) bei Mais (als Beispielkultur für NawaRo mit geringer Bodendeckerwirkung)**



Abbildung 14: Mais-Parzellen mit und ohne Antibiotika-dotierter Gärrestbeaufschlagung mit (rechts) und ohne (links) Luzerneuntersaat; Kontrollparzelle (Mitte) zur Hälfte mit Luzerneuntersaat

## Chlorosen



Abbildung 15: Chlorosen an Mais und Luzerne (Mais-Parzelle mit Antibiotika-dotierter Gärrestbeaufschlagung und Luzerneuntersaat)

Die mit dotiertem Gärrest beaufschlagten Parzellen zeigten typische Chlorosen an Mais- und Luzerneblättern, was auf die Aufnahme in den Pflanzenkörper und partiell toxische Wirkung von Fluorchinolonen hinweist. Insgesamt waren die mit Fluorchinolonen dotierten Parzellen gegenüber der Kontrollvariante im Wachstum nur leicht gehemmt.



Abbildung 16: Chlorosen an Mais (Mais-Parzelle mit Antibiotika-dotierter Gärrestbeaufschlagung und Luzerneuntersaat)

## Ergebnisse der langzeitigen Abbauprobe inkl. der Proben aus größerer Bodentiefe

Im Zuge des Langzeitmonitorings der Versuchspartzen wurden Bodenproben anhand der beschriebenen Messmethodik in regelmäßigen Abständen beprobt. Im Ergebnis lässt sich detailliert nachvollziehen, wie die Ab- und Umbauprozesse im Versuchszeitraum unter variierenden Umwelteinflüssen fluktuieren. Die so erzeugte Datengrundlage stellt in Verbindung mit der Onsite-Sensorik die Möglichkeit zur langfristigen systematischen Überwachung, Bewertung und Schutz von Böden in Aussicht. Beispielhaft sind dazu nachfolgend Auszüge aus Abbauprobe der untersuchten Fluorchinolone in verschiedenen Versuchspartzen dargestellt.

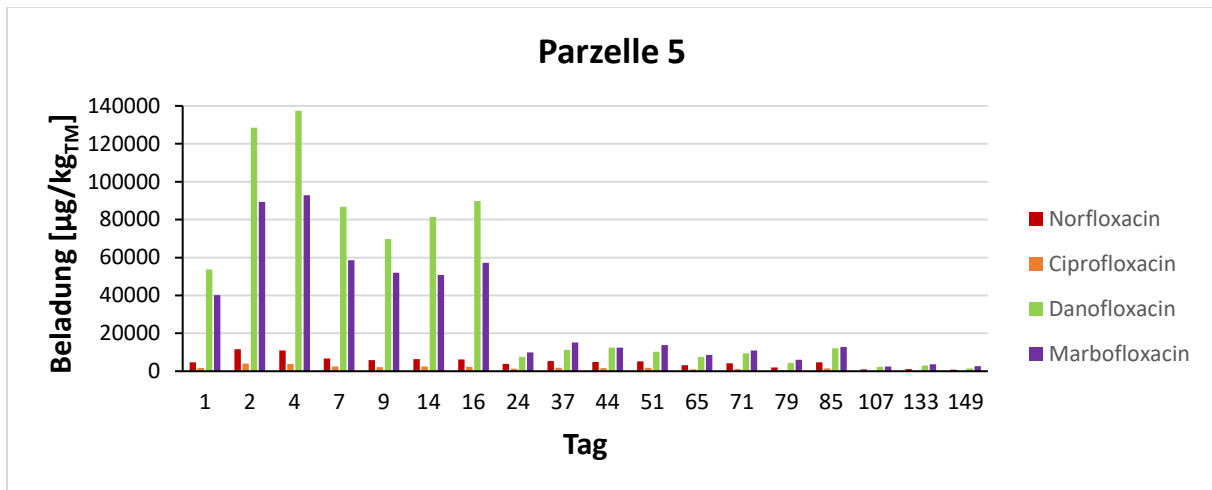


Abbildung 17: Darstellung der Ergebnisse der Langzeitversuche zum Abbau von Fluorchinolonen auf Versuchspartzen

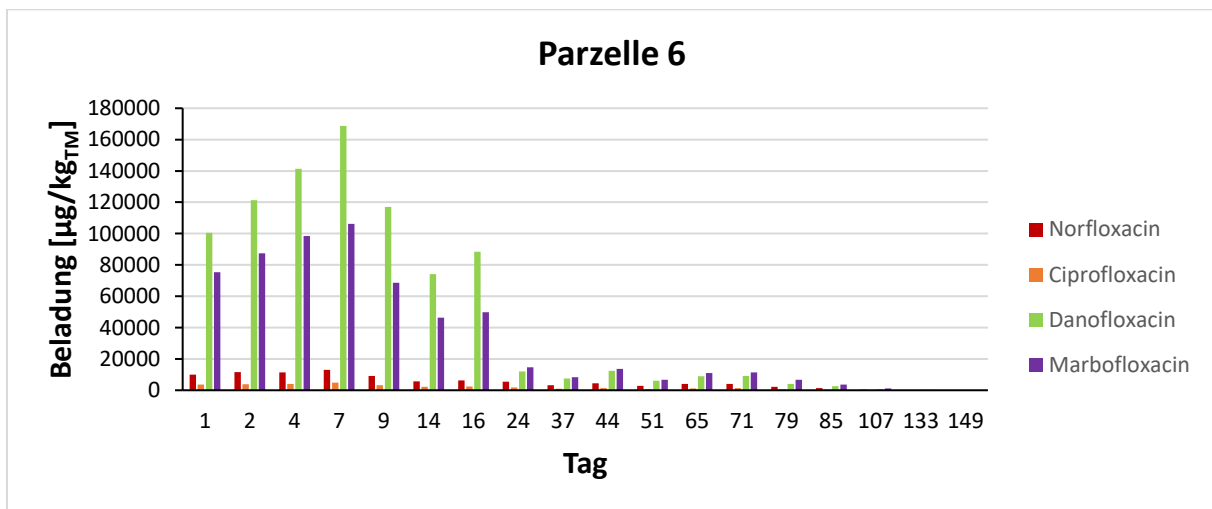


Abbildung 18: Darstellung der Ergebnisse der Langzeitversuche zum Abbau von Fluorchinolonen auf Versuchspartzen

Um eine multidimensionale Beprobung der Versuchspartzen zu gewährleisten und mit Sensorikmesswerten korrelieren zu können, wurden die Partzen in verschiedenen Bodentiefen unter Zuhilfenahme eines Bodenprobenehmers untersucht. Hierbei lag das Augenmerk auf der Verdriftung von Antibiotika in tiefere Bodenschichten durch Leaching- und Adsorptionsprozesse. Vorrangig ging es darum die Erkenntnisse aus Perkolator- und Lysimeterprüfständen über den Verbleib der eingesetzten Antibiotika vom labortechnischen Maßstab in der praxisnahen landwirtschaftlichen Umgebung nachvollziehen zu können.

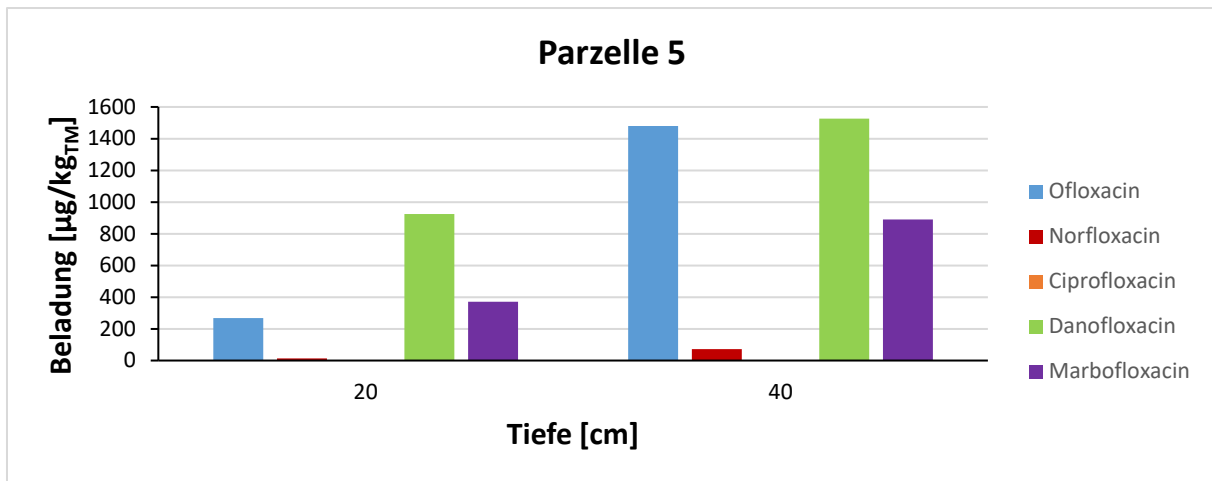


Abbildung 19: Darstellung der Ergebnisse der Verdriftung von Fluorchinolonen in tiefere Bodenschichten auf Versuchspartzellen

## 2 Entwicklung und Aufbau eines Prüfstandes zur Simulation des Abbaus (und Leaching) von Pharmaka über Bodenprozesse

### 2.1 Bodenlysimeter (Labor- und kleintechnisch)

Die Beprobung der Perkolatoren im labortechnischen Maßstab erfolgte schichtweise, um die Verdriftung der Fluorchinolone durch adsorptive Prozesse in tiefere Bodenschichten qualitativ nachvollziehen zu können.

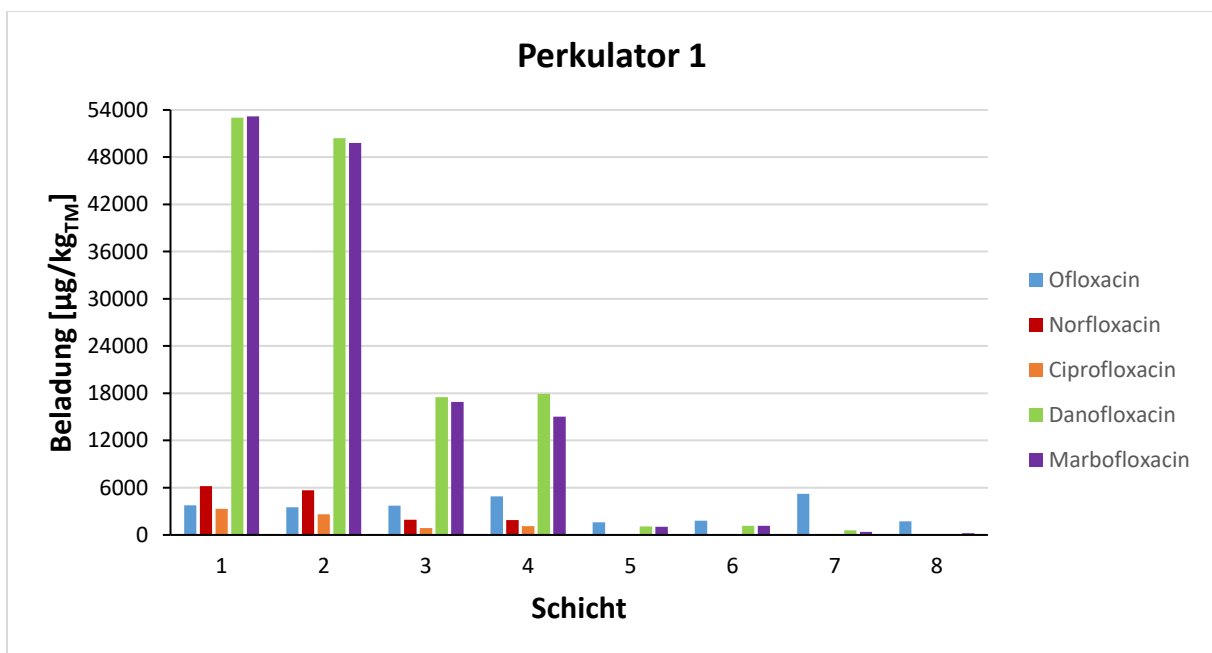


Abbildung 20: Darstellung der Ergebnisse der Perkolatorversuche zur Verdriftung von Fluorchinolonen in labortechnischen Umweltsimulationen

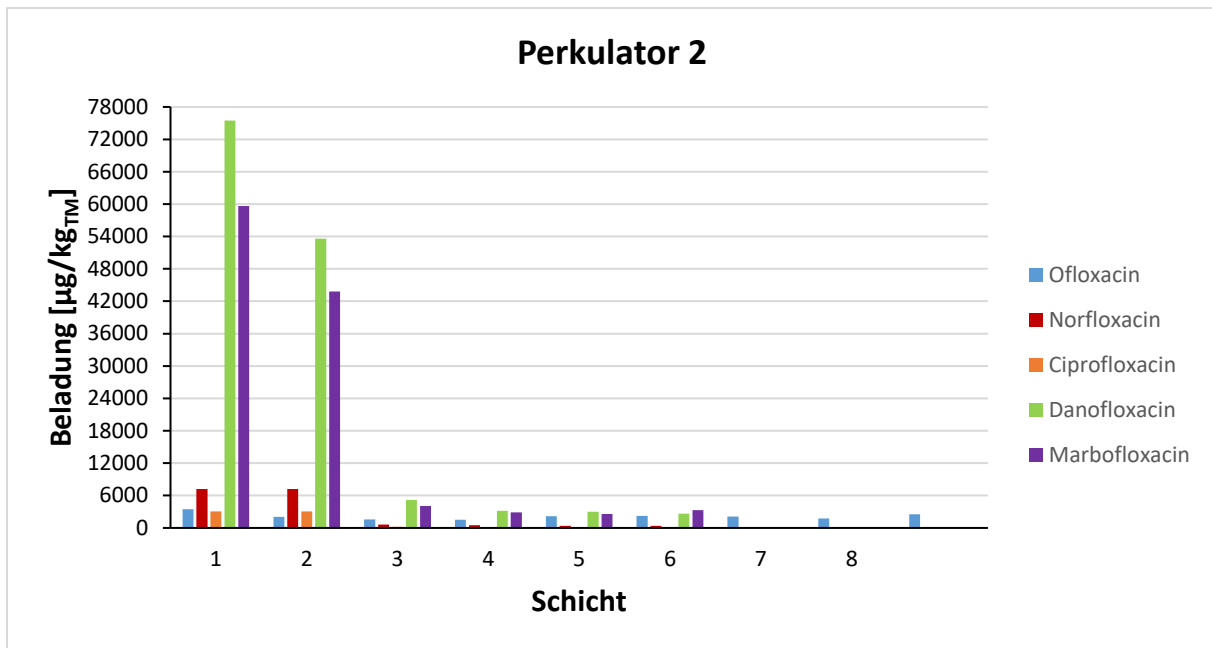


Abbildung 21: Darstellung der Ergebnisse der Perkulatorversuche zur Verdriftung von Fluorchinolonen in labortechnischen Umweltsimulationen

Die Untersuchungen des durch Bewässerung erzeugten ‚Runoffs‘ ergab in der Flüssigphase keine detektierbaren Konzentrationen der eingesetzten Substanzen. Im dargestellten Chromatogramm sind neben dem diskreten Signal des internen Standards (oben) keine weiteren Analytensignale (rauschen, unten) nachweisbar. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Interaktion zwischen Bodenpartikeln und den Fluorchinolonen stark ausgeprägt ist und eine Auswaschung über die flüssige Phase im Untersuchungszeitraum nicht nachzuweisen war.

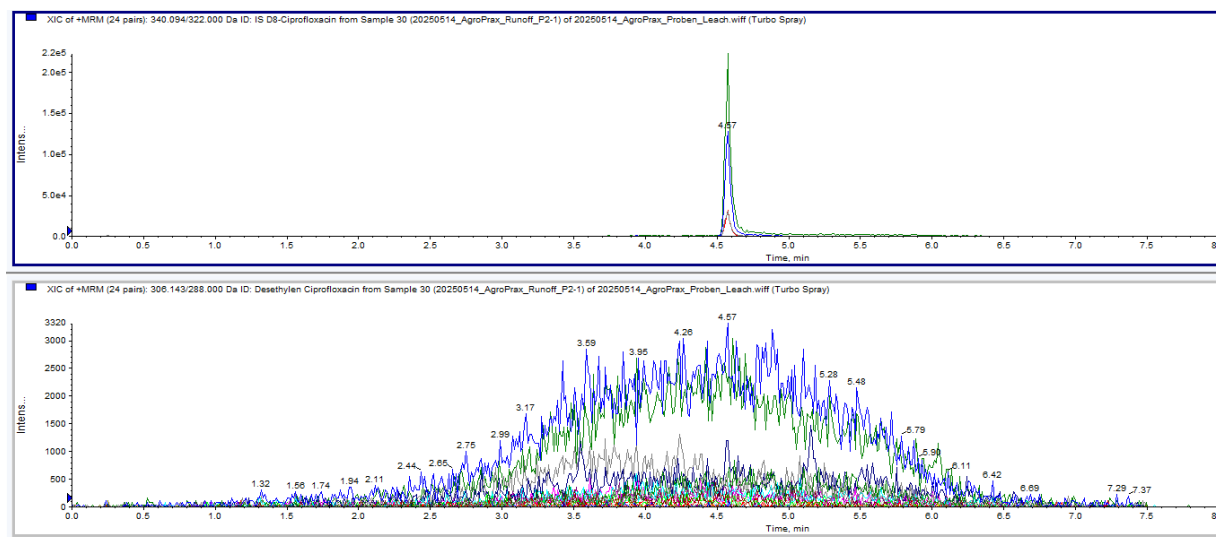


Abbildung 22: Chromatogramm der Messung des Runoffs aus Perkulatorversuchen ohne Wiederfindung

## 2.2 Begleitende Sensorik für Umweltparameter (Feuchte, Temperatur)

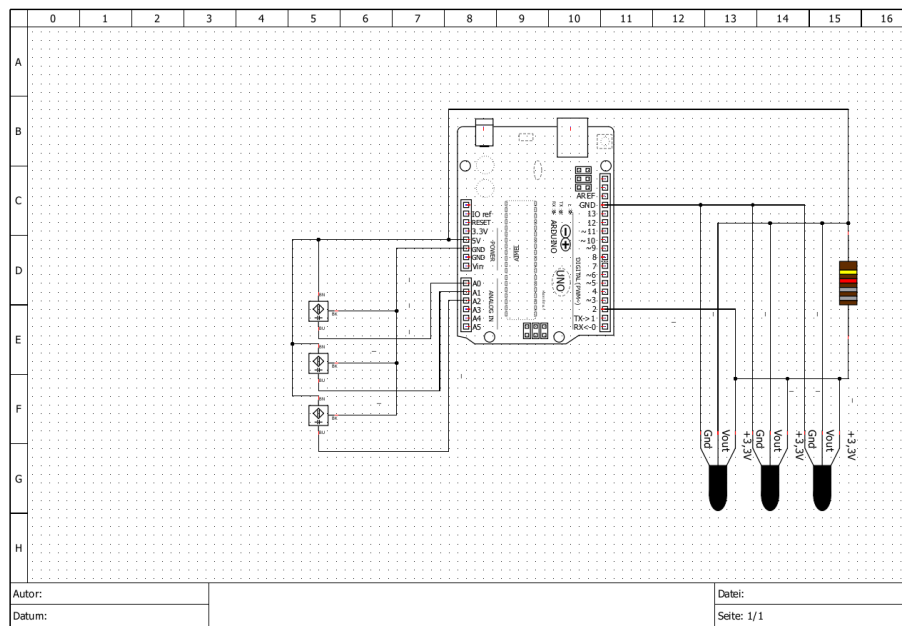


Abbildung 23: Schaltplan zur etablierten Umweltsensorik für Bodenfeuchte- und Temperatur

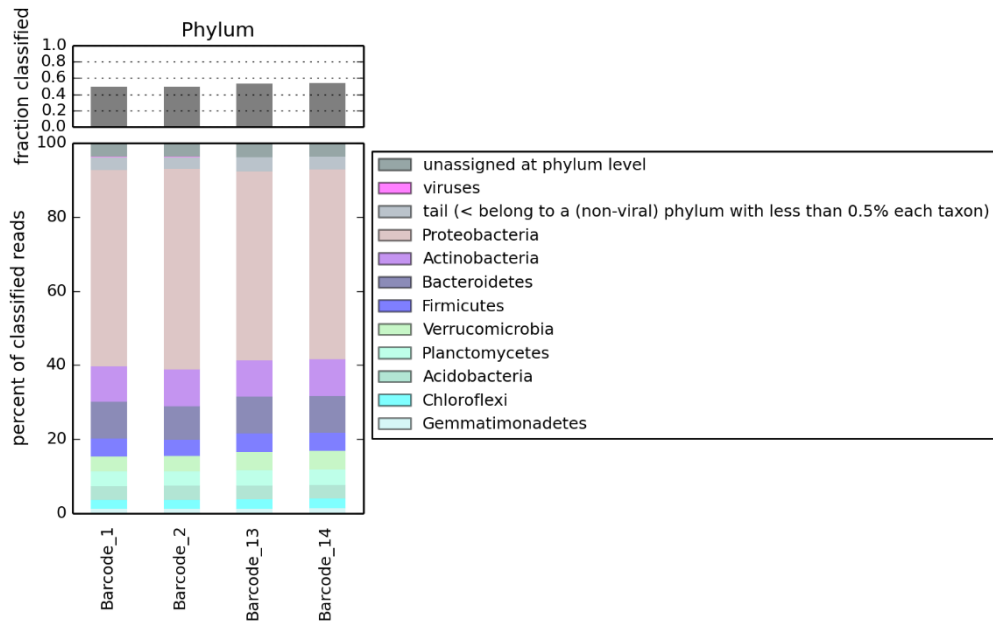
Die im Perkolatorprüfstand konstruierte Messsensorik für Bodenfeuchte und -temperatur konnte erfolgreich kalibriert und auf verschiedenen Bodenmatrices adaptiert werden. Eine Onsite-Überwachung der kritischen Umweltparameter konnte somit in der praxisnahen Umgebung des Lysimeterprüfstands zum Einsatz kommen.

### 3 Entwicklung von analytischen Konzepten und Methoden unter Nutzung von metagenomischen Daten

#### 3.2 Untersuchungen des Bodenmikrobioms

Die statistische Verteilung der taxonomischen Klassifizierung für die Doppelbestimmung einer repräsentativen Beprobungen wird hier beispielhaft analysiert und mit der Wahrscheinlichkeit des Vorkommens in landwirtschaftlichen Bodenproben verglichen.

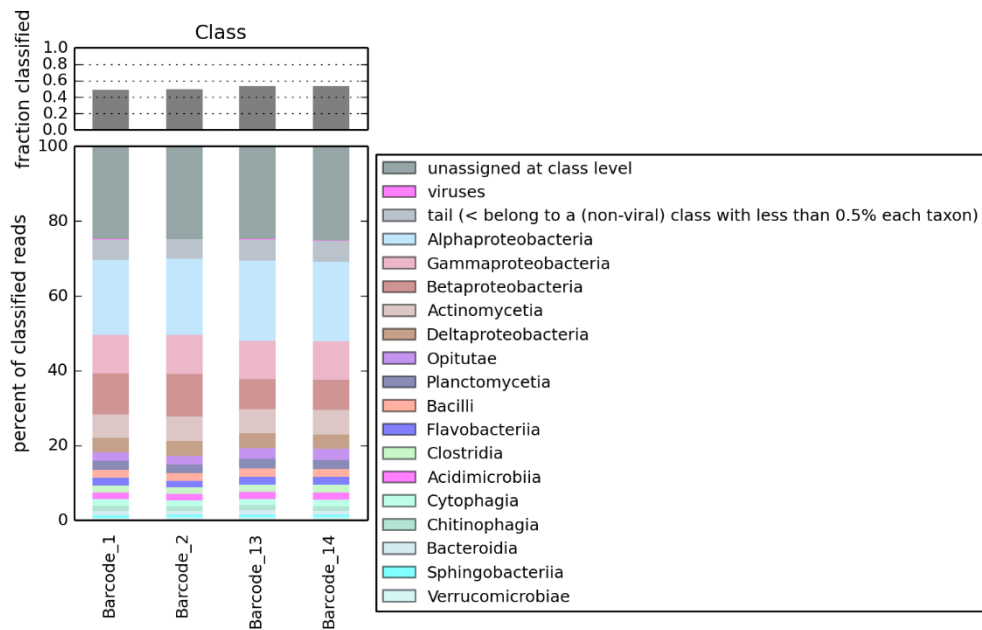
##### a) Phylum-Ebene



| Phylum          | Barcode 1 (ca.) | Barcode 13 (ca.) | Durchschnitt (ca.) |
|-----------------|-----------------|------------------|--------------------|
| Proteobacteria  | 45%             | 43%              | 44%                |
| Actinobacteria  | 15%             | 17%              | 16%                |
| Bacteroidetes   | 10%             | 12%              | 11%                |
| Firmicutes      | 8%              | 7%               | 7.5%               |
| Verrucomicrobia | 5%              | 4%               | 4.5%               |
| Viruses         | 3%              | 3%               | 3%                 |
| Unklassifiziert | 14%             | 14%              | 14%                |

**Proteobacteria** dominieren mit ca. 44% und sind typisch für Bodenproben. **Actinobacteria** und **Bacteroidetes** sind ebenfalls stark vertreten und häufig in Böden zu finden. **Firmicutes** und **Verrucomicrobia** sind in geringeren Mengen vorhanden, aber ebenfalls typisch für Böden. Ein signifikanter Anteil bleibt **unklassifiziert**.

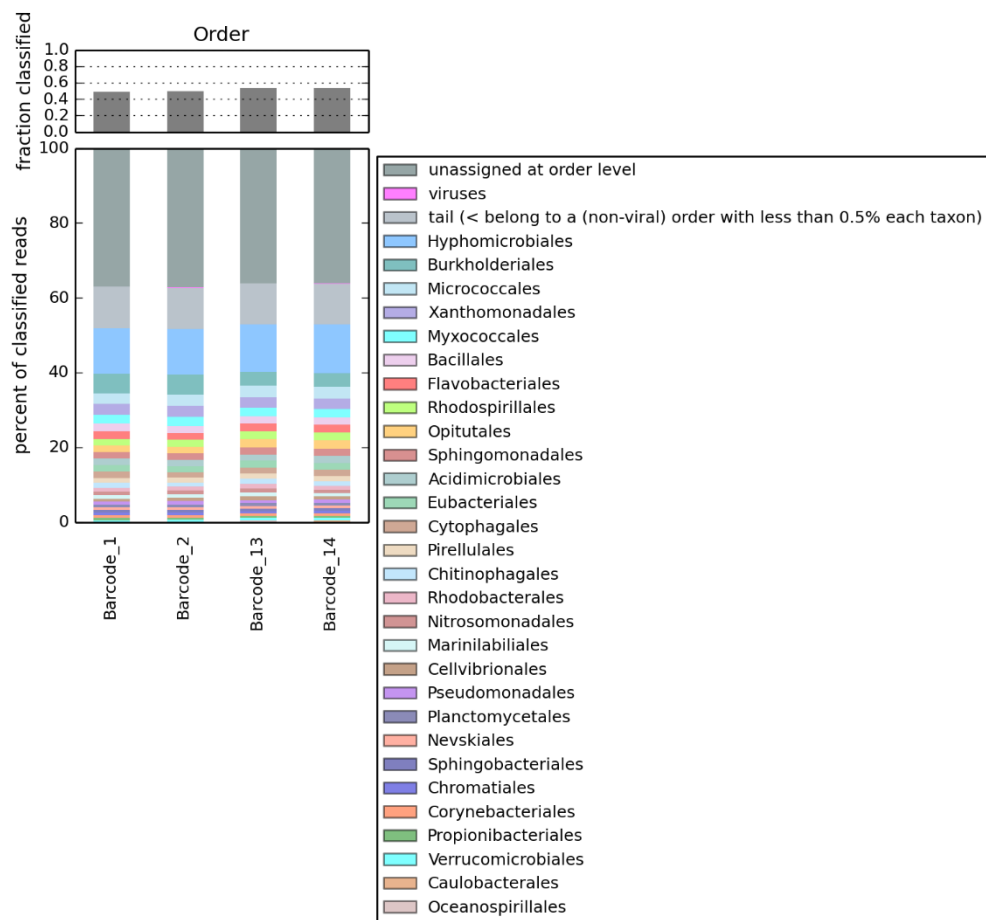
## b) Klasse-Ebene



| Klasse              | Barcode 1 (ca.) | Barcode 13 (ca.) | Durchschnitt (ca.) |
|---------------------|-----------------|------------------|--------------------|
| Gammaproteobacteria | 20%             | 22%              | 21%                |
| Alphaproteobacteria | 15%             | 14%              | 14.5%              |
| Betaproteobacteria  | 10%             | 9%               | 9.5%               |
| Actinobacteria      | 15%             | 17%              | 16%                |
| Unklassifiziert     | 25%             | 24%              | 24.5%              |

**Gammaproteobacteria** sind die häufigste Klasse innerhalb der Proteobacteria. **Alphaproteobacteria** und **Betaproteobacteria** sind ebenfalls stark vertreten. **Actinobacteria** sind in beiden Barcodes ähnlich häufig. Ein großer Anteil bleibt **unklassifiziert**.

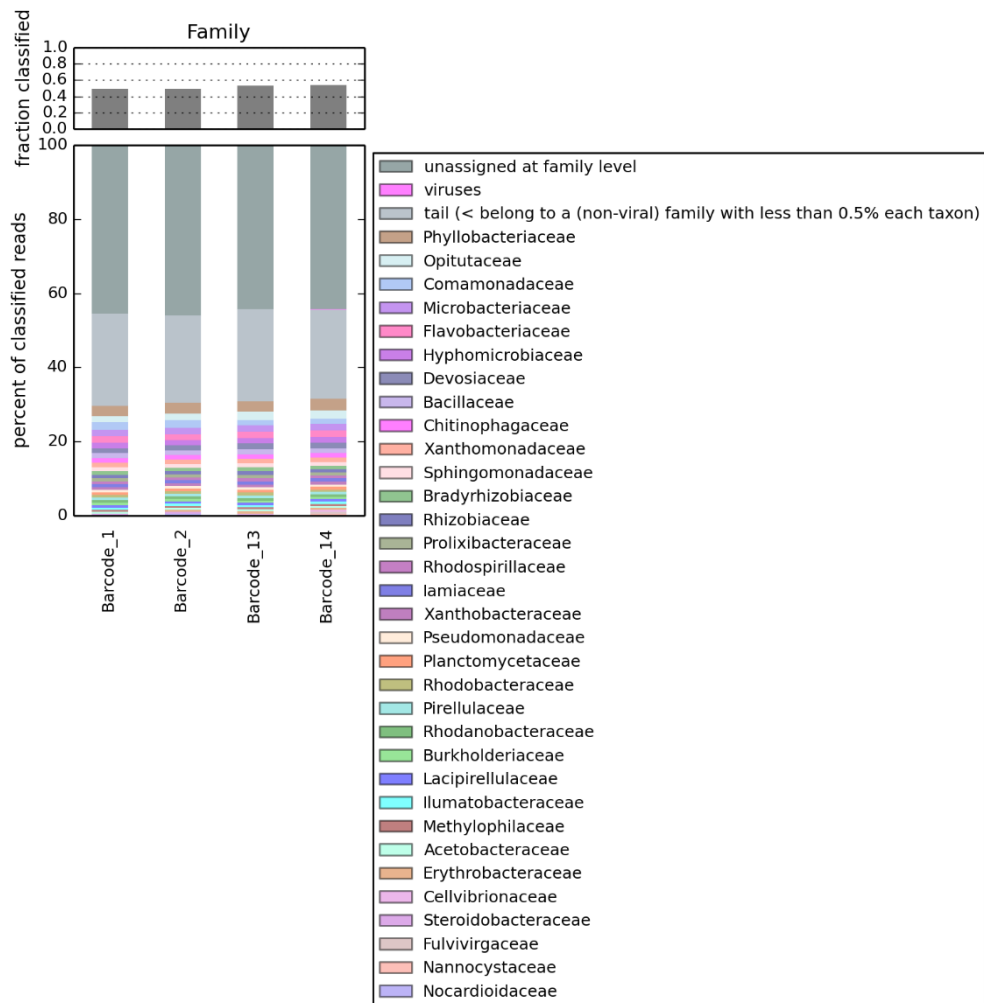
### c) Ordnung-Ebene



| Ordnung          | Barcode 1 (ca.) | Barcode 13 (ca.) | Durchschnitt (ca.) |
|------------------|-----------------|------------------|--------------------|
| Burkholderiales  | 15%             | 16%              | 15.5%              |
| Hyphomicrobiales | 10%             | 9%               | 9.5%               |
| Micrococcales    | 8%              | 7%               | 7.5%               |
| Xanthomonadales  | 7%              | 8%               | 7.5%               |
| Unklassifiziert  | 30%             | 29%              | 29.5%              |

**Burkholderiales** sind die häufigste Ordnung. **Hyphomicrobiales**, **Micrococcales**, und **Xanthomonadales** sind ebenfalls stark vertreten. Ein großer Anteil bleibt **unklassifiziert**.

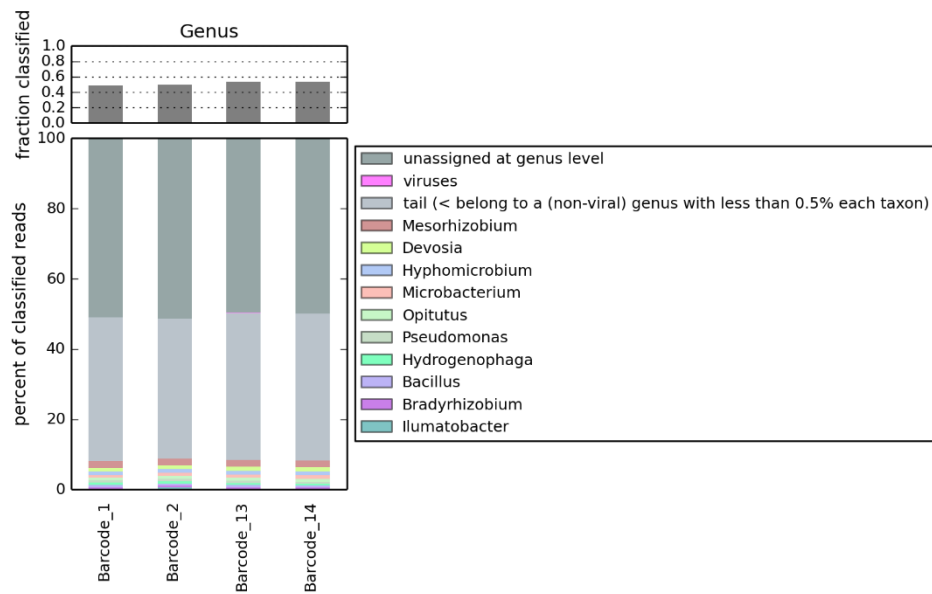
#### d) Familie-Ebene



| Familie           | Barcode 1 (ca.) | Barcode 13 (ca.) | Durchschnitt (ca.) |
|-------------------|-----------------|------------------|--------------------|
| Unklassifiziert   | 30%             | 32%              | 31%                |
| Comamonadaceae    | 10%             | 9%               | 9.5%               |
| Microbacteriaceae | 8%              | 7%               | 7.5%               |
| Flavobacteriaceae | 7%              | 8%               | 7.5%               |
| Hyphomicrobiaceae | 5%              | 6%               | 5.5%               |
| Bacillaceae       | 4%              | 5%               | 4.5%               |
| Chitinophagaceae  | 3%              | 4%               | 3.5%               |

**Comamonadaceae, Microbacteriaceae, und Flavobacteriaceae** sind die häufigsten Familien. Ein großer Anteil bleibt **unklassifiziert**.

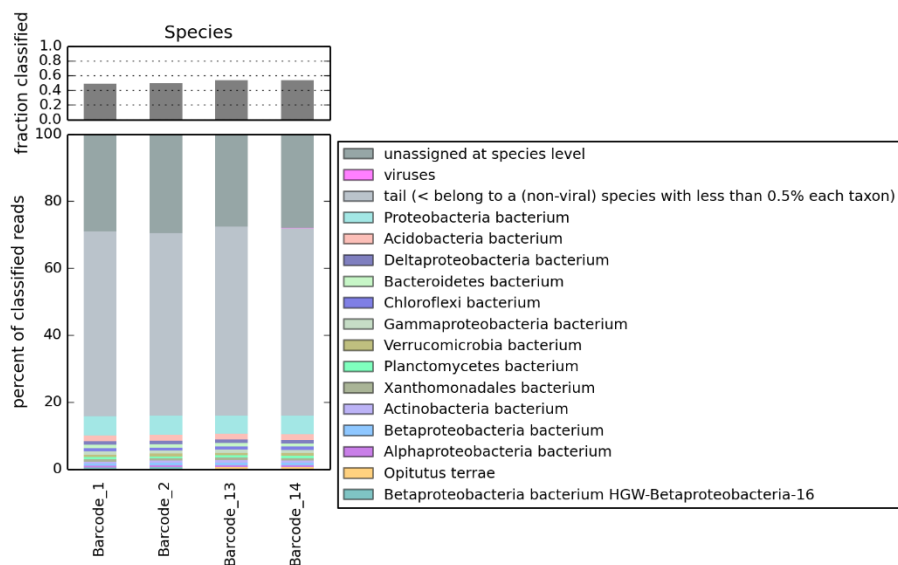
## e) Genus-Ebene



| Genus           | Barcode 1 (ca.) | Barcode 13 (ca.) | Durchschnitt (ca.) |
|-----------------|-----------------|------------------|--------------------|
| Unklassifiziert | 40%             | 42%              | 41%                |
| Mesorhizobium   | 8%              | 7%               | 7.5%               |
| Devosia         | 6%              | 5%               | 5.5%               |
| Hyphomicrobium  | 5%              | 6%               | 5.5%               |
| Microbacterium  | 4%              | 5%               | 4.5%               |

**Mesorhizobium, Devosia, Hyphomicrobium, und Microbacterium** sind die häufigsten Gattungen. Ein großer Anteil bleibt **unklassifiziert**.

## f) Spezies-Ebene



| Spezies                       | Barcode 1 (ca.) | Barcode 13 (ca.) | Durchschnitt (ca.) |
|-------------------------------|-----------------|------------------|--------------------|
| Unklassifiziert               | 80%             | 82%              | 81%                |
| Proteobacteria bacterium      | 5%              | 4%               | 4.5%               |
| Acidobacteria bacterium       | 3%              | 3%               | 3%                 |
| Deltaproteobacteria bacterium | 2%              | 2%               | 2%                 |

Die meisten Reads bleiben auf Spezies-Ebene **unklassifiziert**. Einige Arten wie **Proteobacteria bacterium** und **Acidobacteria bacterium** sind vertreten.

Die Ergebnisse werden in taxonomischen Ebenen (Phylum, Klasse, Ordnung, Familie, Gattung, Art) zusammengefasst. Die bereitgestellten Plots zeigen die Verteilung der klassifizierten Reads auf diesen Ebenen für eine repräsentative Bodenproben einer Versuchsparzelle. Die Plots zeigen, dass die Verteilung der Taxa zwischen den Barcodes 1/2 und 13/14 sehr ähnlich ist. Dies bestätigt die Reproduzierbarkeit der Klassifizierung und die Zuverlässigkeit der Ergebnisse. Die Doppelbestimmung (Barcode 1 vs. Barcode 2 und Barcode 13 vs. Barcode 14) und die Doppeldurchführung (Barcode 1/2 vs. Barcode 13/14) zeigen konsistente Ergebnisse, was auf eine robuste Methodik hinweist. Somit lässt sich für die etablierte bioanalytische Verfahrensentwicklung feststellen, dass die Auswertung mit dem Kaiju-Workflow eine sensitive und schnelle Klassifizierung von Metagenom-Daten auf Protein-Ebene zulässt. Die Ergebnisse sind reproduzierbar und zeigen eine konsistente Verteilung der Taxa über verschiedene Barcodes hinweg. Die Klassifizierung ist auf höheren taxonomischen Ebenen (Phylum, Klasse, Ordnung) am aussagekräftigsten, während die Auflösung auf Art-Ebene oft begrenzt ist. Die taxonomische Verteilung in den Proben entspricht weitgehend dem, was man in landwirtschaftlichen Bodenproben erwarten würde. Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, und Firmicutes sind typische und häufige Phyla in Böden. Die häufigsten Klassen und Ordnungen sind ebenfalls typisch für landwirtschaftliche Böden. Ein signifikanter Anteil der Reads bleibt unklassifiziert, was auf die Komplexität und Vielfalt der mikrobiellen Gemeinschaften in Böden hinweist und die Anwendung spezialisierter Referenzdatenbanken für zukünftige Untersuchungen nahelegt.

### 3.3 Angepasster Toxizitätstest: Pflanzentest

|                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                            |                                                                                               |
| <p>Pflanzentest Kontrolle<br/>(an Gerste, Weizen und Kresse)<br/>mit 5% (vordere Reihe),<br/>10% mittlere Reihe und<br/>20% undotiertem Gärrestanteil (hintere Reihe)<br/>nach 23 Tagen</p> | <p>Pflanzentest<br/>(an Gerste, Weizen und Kresse)<br/>mit 5% (vordere Reihe),<br/>10% mittlere Reihe und<br/>20% dotiertem Gärrestanteil (hintere Reihe)<br/>nach 23 Tagen</p> |
|                                                                                                           |                                                                                              |
| <p>Pflanzentest<br/>an Gerste<br/>mit 20% undotiertem (links) und<br/>20% dotiertem Gärrestanteil (rechts)<br/>nach 30 Tagen</p>                                                            | <p>Pflanzentest<br/>an Kresse<br/>mit 20% undotiertem (links) und<br/>20% dotiertem Gärrestanteil (rechts)<br/>nach 30 Tagen</p>                                                |

Der Pflanzentest an Gerste, Weizen und Kresse erwies sich als sehr aussagefähig und stellt einen direkten Praxisbezug her. In Abhängigkeit vom Gärrestanteil zeigten die dotierten Varianten mehr oder weniger starke Chlorosen an den Testpflanzen. Die Kresse erwies sich dabei als besonders empfindlich, was sich in auffälligen Keim- und Wachstumsstörungen zeigte. Fluorchinolone greifen offensichtlich in den pflanzlichen Primär- und Sekundärstoffwechsel ein.

## Mikrobiologische Untersuchungen (IUM Erfurt)

### Parzellenversuche Mais (mit und ohne Luzerne- Untersaat)

In Bodenproben aus den Parzellenversuchen wurden die Gesamtmenge kultivierbarer Mikroorganismen sowie die unter ‚Material und Methoden‘ genannten semiquantitativ bestimmt. Alle Keimzahlen wurden als Koloniebildende Einheiten pro Gramm [KbE/g] angegeben. Die Freilandproben wurden über den Zeitraum einer Vegetationsperiode von Juni – November entnommen. Diese waren natürlichen Temperaturschwankungen im Jahresverlauf (ca 10 – 22 °C) ausgesetzt

Die Gesamtmenge der kultivierbaren Mikroorganismen stieg nach Zugabe der Gärreste mit und ohne Dotierung mit Antibiotika zunächst an, sank nach 14 d in den Laborversuchen und war nach spätestens 48 d auf niedrigem Niveau konstant.

Das Verhältnis Bakterien/Pilze lag jeweils bei ca. 18 : 1 und blieb unverändert.

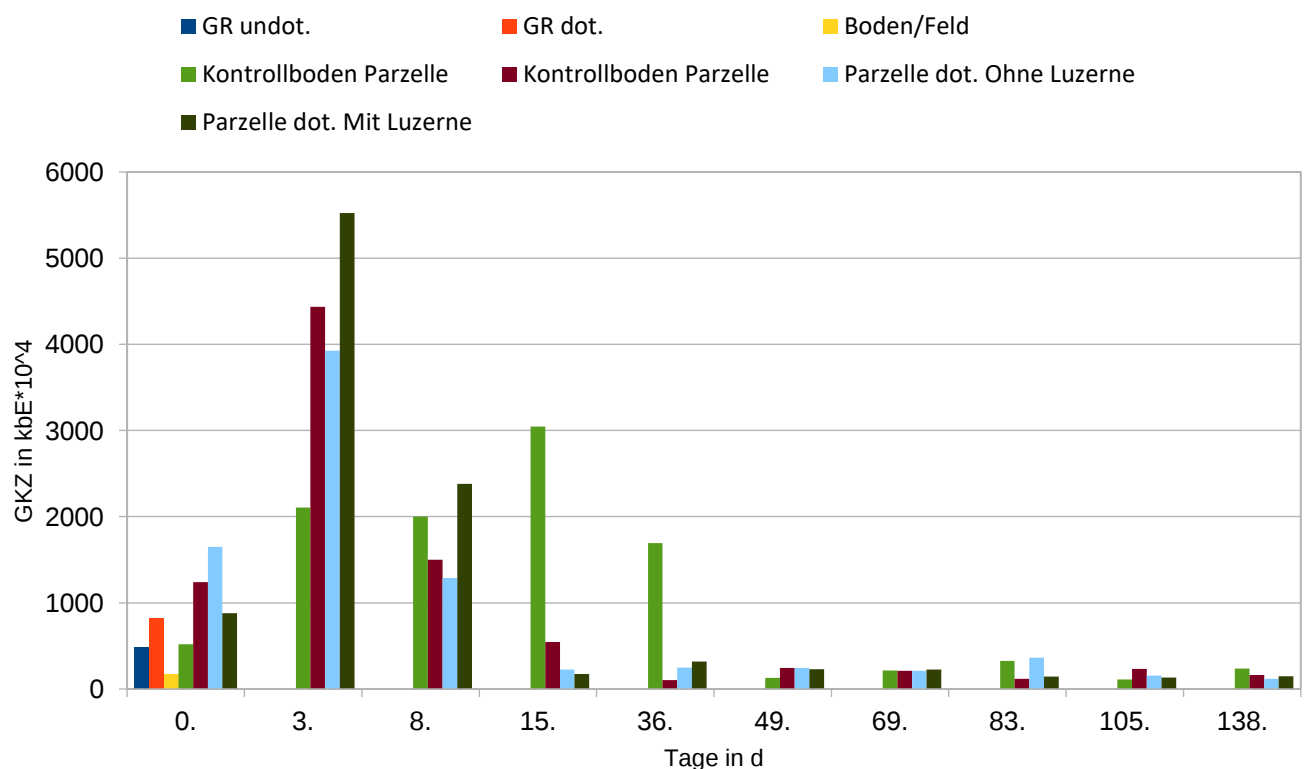


Abb. 1: Gesamtzahl kultivierbarer Mikroorganismen [koloniebildende Einheiten pro g Trockenmasse (kbE/g)]

Die als hygienerelevant betrachteten und als mögliche Träger von Resistenzen untersuchten Gruppen kamen in sehr geringen Anteilen vor (< 1 %).

Tab. 1: Anzahl ausgewählte Bakteriengruppen [koloniebildende Einheiten pro g Trockenmasse (kbE/g)];  
n.n. = nicht nachgewiesen

|                    | d 0<br>K | d 3<br>Kontr | d 3<br>dot | d15<br>Kontr | d 15<br>dot | d 49<br>Kontr | d 49<br>dot |
|--------------------|----------|--------------|------------|--------------|-------------|---------------|-------------|
| Enterobacteriaceae | 500      | 1200         | n.n.       | 3600         | n.n.        | 40            | 100         |
| Escherichia coli   | n.n.     | n.n.         | n.n.       | n.n.         | n.n.        | n.n.          | n.n.        |
| Enterokokken       | 200      | 550          | 10         | 150          | 10          | n.n.          | 10          |
| Pseudomonas spec.  | n.n.     | n.n.         | n.n.       | n.n.         | n.n.        | n.n.          | n.n.        |

Ein temporärer Anstieg der Zahl von Enterobacteriaceae war wahrscheinlich durch die Zugabe von bakterien- und nährstoffhaltigem Gärrest verursacht und trat ausschließlich in den nicht dotierten Proben auf.

Zeitgleich konnte ein steigendes Wachstum von Actinomyceten gemessen werden, das nach 7 d messbar war und über 2 Monate verfolgt wurde.

Wegen der kulturmorphologischen Besonderheiten dieser Organismengruppe (Bildung von verzweigten Mycelien) lässt sich dies nicht in gleicher Weise darstellen. In Tabelle 2 sind daher die relativen Häufigkeiten angegeben

Der Anteil der Gattung *Streptomyces* war mit ca 75 % dominierend. Daneben wurden *Nocardia* und *Actinomyces* identifiziert.

Tab. 2: Anzahl Actinomyceten ( ++ häufig, + vereinzelt)

|                      | d 0<br>K  | d 3<br>Kontr | d 3<br>dot | d15<br>Kontr | d 15<br>dot | d 49<br>Kontr | d 49<br>dot |
|----------------------|-----------|--------------|------------|--------------|-------------|---------------|-------------|
| <b>Actinomyceten</b> | <b>++</b> | <b>+</b>     | <b>++</b>  | <b>++</b>    | <b>++</b>   | <b>++</b>     | <b>++</b>   |
| Streptomyces         | +         | +            | ++         | ++           | ++          | ++            | ++          |
| Nocardia             | +         | +            | +          |              | +           | +             | +           |
| - sonstige -         | +         | +            | +          |              | +           |               | +           |

Die kultivierten Bodenpilze waren bei schwankender Gesamtmenge auch in ihrem Artenspektrum sehr variabel. Die Kulturverfahren führen möglicherweise zu Überbefunden stark sporulierender Gruppen. Daher sind quantitative Ergebnisse mit großer Messunsicherheit behaftet.

Vorherrschende Gruppen waren *Zygomyceten* (*Mucor*, *Rhizopus*), *Cladosporium* und sterile Mycelien. Direktmikroskopische Untersuchungen ließen auf eine Wachstumsförderung schließen.

Tab. 3: Anzahl ausgewählte Pilzgruppen [koloniebildende Einheiten  $\times 10^2$  pro g Trockenmasse (kbE/g)];  
n.n. = nicht nachgewiesen

|                       | d 0<br>K  | d 3<br>Kontr | d 3<br>dot | d15<br>Kontr | d 15<br>dot | d 49<br>Kontr | d 49<br>dot |
|-----------------------|-----------|--------------|------------|--------------|-------------|---------------|-------------|
| <b>Gesamtkeimzahl</b> | <b>55</b> | <b>155</b>   | <b>280</b> | <b>160</b>   | <b>135</b>  | <b>120</b>    | <b>215</b>  |
| Zygomyceten           | 20        | 25           | 44         | 35           | 40          | 15            | 50          |
| Cladosporium          | 17        | 50           | 160        | 65           | 45          | 65            | 55          |
| Steriles Mycel        | 12        | 75           | 70         | 45           | 30          | 10            | 85          |
| Trichoderma           | 3         | 2            | 4          | 2            | 8           | 20            | 15          |
| Aureobasidium         | n.n.      | 6            | n.n.       | 5            | 2           | n.n.          | 5           |
| Alternaria            | 1         | 1            | 1          | 3            | 5           | 10            | n.n.        |
| Verticillium          | 1         | 6            | n.n.       | 3            | 5           | n.n.          | n.n.        |
| Botrytis              | n.n.      | n.n.         | 1          | 2            | n.n.        | n.n.          | 5           |

Die in **tieferen Bodenschichten** der Parzellen entnommenen Proben zeigten eine Organismenkonzentration auf deutlich niedrigerem Niveau. Die vergleichsweise hohe Konzentration von Mikroorganismen im ausgebrachten Gärrest war nach Versuchsende in der Bodentiefe deutlich reduziert wiedergefunden worden.

Tab. 4: Gesamtzahl und Anzahl ausgewählte Bakteriengruppen [koloniebildende Einheiten pro g Trockenmasse (kbE/g)]; n.n. = nicht nachgewiesen

|                                 | Konzentration [ kbE/ g] |
|---------------------------------|-------------------------|
| Obere Schicht GKZ<br>0 - 5 cm   | $2,1 \cdot 10^8$        |
| Enterobacteriaceae              | $1,1 \cdot 10^3$        |
| mittlere Schicht GKZ<br>< 20 cm | $3,0 \cdot 10^4$        |
| Enterobacteriaceae              | $1,0 \cdot 10^2$        |
| tiefer Schicht GKZ<br>40 cm     | $1,8 \cdot 10^4$        |
| Enterobacteriaceae              | n.n.                    |

Um den Einfluss des Besatzes mit Kulturpflanzen zu bestimmen, wurden in Gefäßkulturen Proben vor und nach Auflaufen von Kresse, Weizen und Gerste untersucht. Dabei kamen unterschiedliche Mengenanteile von dotiertem und undotiertem Gärrest zum Einsatz (hier nur für Kresse und Gerste dargestellt).

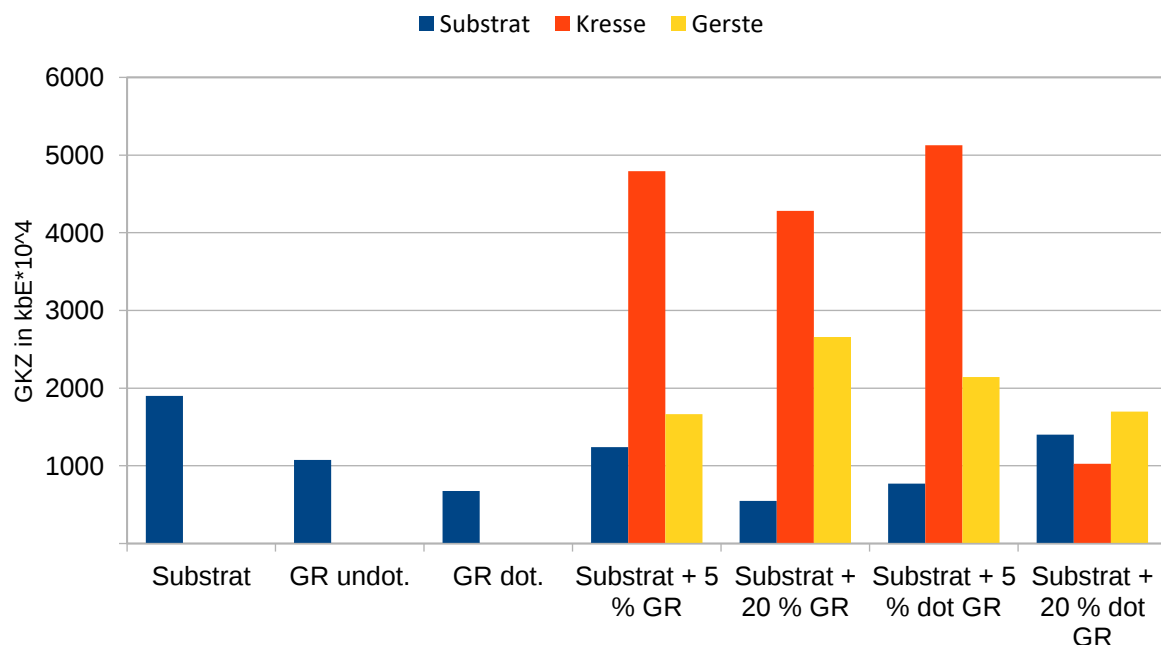


Abb. 4: Gesamtzahl kultivierbarer Mikroorganismen [koloniebildende Einheiten pro g Trockenmasse (kbE/g)]

Der Zusatz von Gärrest führte zu einem verstärkten Wachstum, sowohl bei Kresse als auch Gerste. Die Dotierung ergab jeweils bei geringer Menge (5%) keine Veränderung, ein höherer Anteil (20%) führte vor allem mit Kresse zu einer Reduzierung der Organismenzahl.

## Gefäßversuche zur Kompostierung

In den über einen längeren Zeitraum von 18 Monaten verfolgten Entwicklungen in separaten Gefäßversuchen zur Kompostierung zeigte sich nach anfänglichem Absinken der Gesamtzahlen um 90 - 95 % eine Stabilisierung der Bakteriendichte. Dies wurde nicht durch den anfangs erfolgten Zusatz von dotiertem oder undotiertem Gärrest beeinflusst.

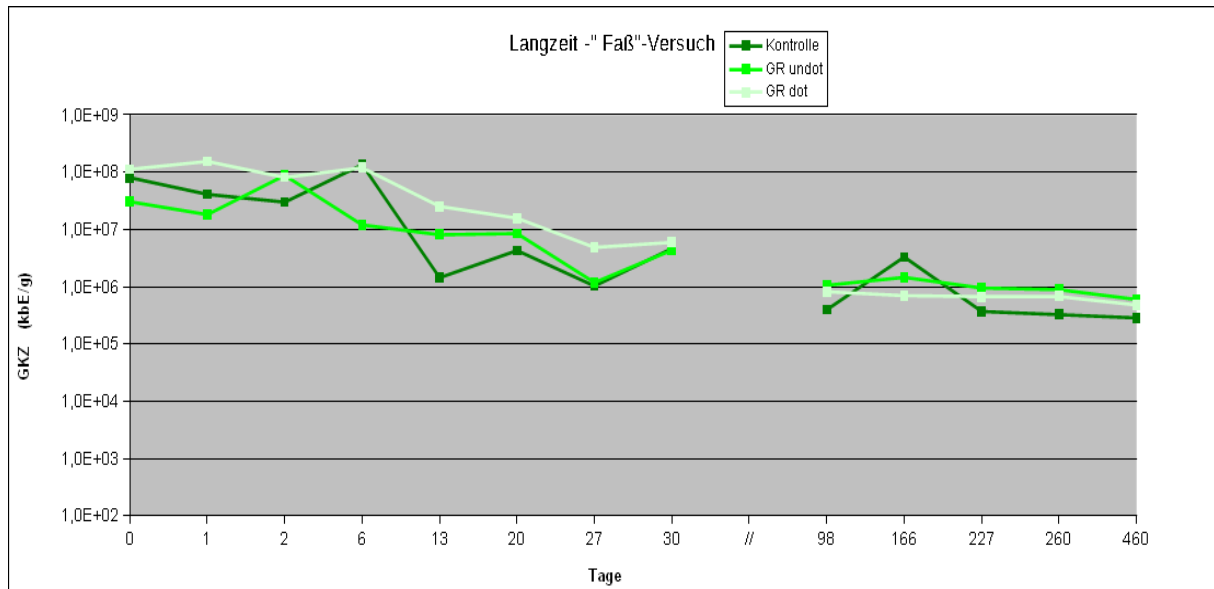


Abb. 2: Gesamtzahl kultivierbarer Mikroorganismen [koloniebildende Einheiten pro g Trockenmasse (kbE/g)]

Die unter den ausgewählten Gruppen am stärksten vertretene der *Enterobacteriaceae* war nach einem Monat in keiner der Ansätze mehr nachweisbar:

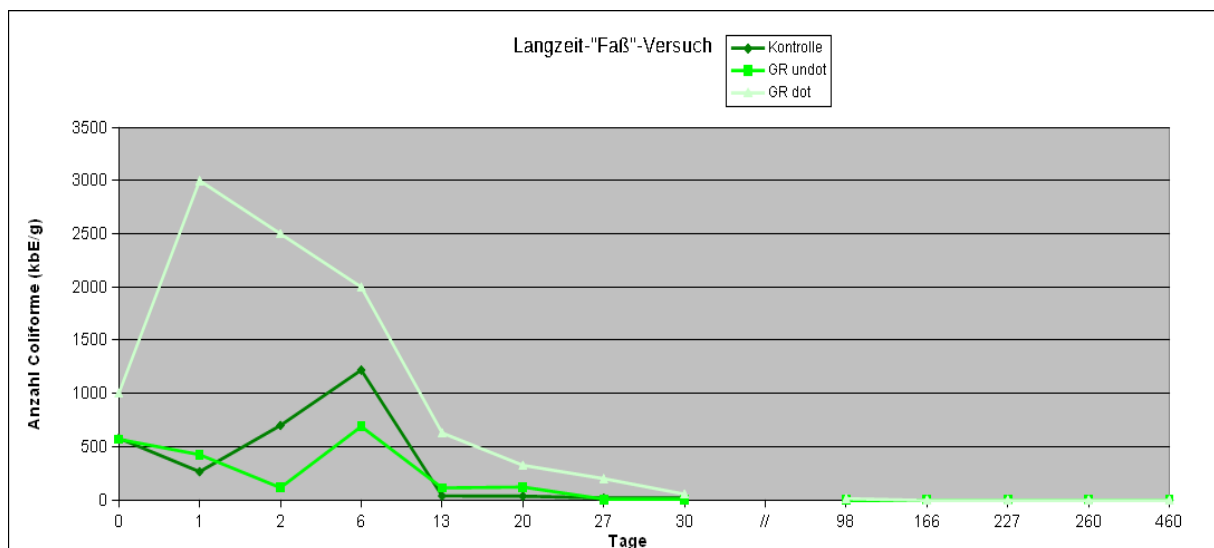


Abb. 3: Zahl kultivierbarer Mikroorganismen *Enterobacteriaceae* [koloniebildende Einheiten pro g Trockenmasse (kbE/g)]

In den ausgewählten Kolonien von *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* und *Pseudomonas* konnten keine phänotypischen Resistenzen gegen die eingesetzten Fluorchinolon- Antibiotika nachgewiesen werden.

## 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 10<sup>th</sup> – 11<sup>th</sup>.

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 10<sup>th</sup> – 11<sup>th</sup>.

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 Völkenrode* 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. Jörgensen (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., Schloter, 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.

Jacobs, A., Schrader, S., Babin, D., Beylich, A., Brunotte, J., Dauber, J., Emmerling, C., Engell, I., Flessa, H., Hallmann, J., Hommel, B., Klages, S., Lehmhus, J., Meyer, M., Meyer-Wolfarth, F., Potthoff, M., Runge, T., Scherber, C., Schikora, A., Schorpp, Q., Schulz-Kesting, K., Smalla, K., Tebbe, C.C., van Capelle, C., M. Varrelmann (2022): Lebendige Böden – fruchtbare Böden. BLE, Bonn.

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.; Weichelt, 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](https://doi.org/10.1897/IEAM_2008-002.1).

Kotzerke, A., Hammesfahr, U., Kleineidam, K., Lamshöft, M., Thiele-Bruhn, S., Schloter, 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.
- Schiesl, S.; Lämmerhofer, M.; Lindner, W. (2010): Multitarget quantitative metabolic profiling of hydrophilic metabolites in fermentation broths of  $\beta$ -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 10<sup>th</sup> – 11<sup>th</sup>.
- 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 10<sup>th</sup> – 11.<sup>th</sup>

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. Razuoli, 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 10<sup>th</sup> – 11<sup>th</sup>.

## Danksagung

Das Team von *AGROPrax* möchte dem (ehemaligen) 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 den Gutachterausschuss sowie die Innovationsdienstleister Frau Bader und Frau Scholle für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung gerichtet.

Nicht zuletzt wollen wir uns in besonderer Weise bei dem im Projekt integrierten Agrarbetrieb Agrargenossenschaft Diedorf/Eichsfeld e.G. sowie dem Institut für Umweltmedizin Erfurt und ihren KollegInnen für die immer sehr freundliche, offene und zuverlässige Mitarbeit und Unterstützung bedanken.