

Transfer von Arzneimittelrückständen  
in Böden und Pflanzen über  
Wirtschaftsdünger tierischer Herkunft

## Zusammenfassung

Arzneimittel werden in der landwirtschaftlichen Tierproduktion zur Krankheitsvorbeugung und -bekämpfung eingesetzt. Nach Anwendung werden die Wirksubstanzen und ihre Abbauprodukte mit dem Urin bzw. Kot ausgeschieden. Über Wirtschaftsdünger wie Gülle oder Festmist können diese Stoffe in Böden eingetragen werden. In den vergangenen Jahren wurden eine Reihe von Studien zum Vorkommen und Verhalten verschiedener Tierarzneimittelwirkstoffe in der Umwelt durchgeführt. Verschiedene Arbeiten zeigen, dass sowohl unter Laborbedingungen als auch unter Feldbedingungen Veterinärpharmaka über den Boden von Wild- und Nutzpflanzen aufgenommen werden können. Allerdings ist die Datenlage in der Literatur insgesamt recht dürftig, es fehlt vor allem an Daten aus Versuchen, die unter praxisrelevanten Bedingungen durchgeführt wurden.

Vor diesem Hintergrund wurde in einem gemeinsamen Forschungsprojekt des CVUA Karlsruhe und des LTZ Augustenberg untersucht, ob zwei in der Nutztierhaltung häufig eingesetzte Antibiotika – Tetracyclin und Enrofloxacin – unter Feldbedingungen über den Pfad Gülle-Boden in Pflanzen gelangen können. Ausführliche Informationen zu den durchgeführten Versuchen und zu den Ergebnissen finden sich auf den nachfolgenden Seiten im Zwischenbericht aus dem Jahr 2009 (beschreibt die Versuche aus dem Jahr 2008) und im ergänzenden Abschlussbericht aus dem Jahr 2010 (fasst die Versuche aus dem Jahr 2009 zusammen). Es wurden umfangreiche Feldversuche mit Mais, Gerste und Weizen durchgeführt. Hierzu wurden zunächst Tetracyclin-haltiger Dünger und Enrofloxacin-haltiger Dünger angesetzt, jeweils einmal mit *realistischer* Wirkstoffkonzentration und einmal mit *Worst-Case*-Konzentration:

Tabelle 1: Konzentrationen der Wirkstoffe im Wirtschaftsdünger

	Tetracyclin	Enrofloxacin
<i>realistischer</i> Ansatz	0,3 mg/l	0,05 mg/l
<i>Worst-Case</i> -Ansatz	7 mg/l	1 mg/l

Das *realistische* Szenario geht von einer sechsmonatigen Mast und einer einmaligen Behandlung zur Einstellprophylaxe über 2 Tage des gülleliefernden Schweinebestandes aus. Das *Worst-Case*-Szenario schließt eine Einstellprophylaxe und zwei zusätzliche Behandlungen mit ein (Erkrankung während der Mast und Erkrankung am Mastende). Nach Ausbringung der Gülle wurden an mehreren Terminen Boden- und Pflanzenproben entnommen und anschließend analysiert. Im Falle der Versuche mit Gerste und Weizen (siehe



Abbildung 1: Modell der Bodenvorgänge

ergänzender Abschlussbericht) waren bereits 20 Tage nach Ausbringung der wirkstoffhaltigen Gülle (erster Probenahmetermin) weder im Boden noch in den Pflanzen Rückstände der Wirkstoffe feststellbar. Dies gilt sowohl für die Versuche mit *realistischen* als auch mit *Worst-Case*-Konzentrationen. Im Falle der Mais-Versuche waren beim Tetracyclin-*Worst-Case*-Experiment in den Bodenproben, die zum Zeitpunkt des 4-6-Blatt-Stadiums entnommen wurden, geringfügige Mengen an Tetracyclin ( $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) nachweisbar (siehe Zwischenbericht). In Bodenproben aus späteren Entnahmeterminen sowie in allen Pflanzenproben waren keine Tetracyclinrückstände nachweisbar. In den *realistischen* Tetracyclin-Versuchen und in sämtlichen Enrofloxacin-Versuchen wurden weder in den Boden- noch in den Pflanzenproben Wirkstoffrückstände gefunden.

Die Untersuchungen zeigen deutlich, dass es unter realen Bedingungen durch Ausbringung von Wirtschaftsdünger, der aus einem behandelten Bestand stammt, zu keinen feststellbaren Tetracyclin- und Enrofloxacinrückständen in Mais, Gerste und Weizen kommt. Auch im Boden sind nach kurzer Zeit keine Wirkstoffe mehr in detektierbaren Konzentrationen zu erwarten.

Ferner wurden im Rahmen dieser Arbeit Gefäßversuche durchgeführt, mit dem Ziel Daten zum zeitlichen Verlauf des Abbaus der Wirkstoffe im Boden zu erhalten (siehe ergänzender Abschlussbericht). Auf der Grundlage von theoretischen Überlegungen und der Versuchsergebnisse wurde eine mathematische Beziehung aufgestellt, die den Abbau der Wirkstoffe im Boden rechnerisch beschreibt und damit prinzipiell Vorhersagen oder Simulationen an einem Rechner ermöglicht. Die Gleichung basiert auf einem Modell, das annimmt, dass sich die Wirkstoffe zwischen dem Boden und dem Bodenwasser verteilen, jedoch nur in gelöster Form abgebaut werden (siehe Abbildung 1). Die allgemeine Form der Gesetzmäßigkeit lautet

$$\frac{\text{Menge zur Zeit } t}{\text{Menge zu Beginn}} = Ce^{\lambda_1 \cdot t} + (1 - C)e^{\lambda_2 \cdot t}$$

wobei die Werte der Parameter  $C$ ,  $\lambda_1$  und  $\lambda_2$  von der Substanz und von den äußeren Bedingungen abhängig sind. Diese Parameter lassen sich für ein

bestimmtes System durch Anpassung des obigen Zusammenhangs an experimentelle Daten ermitteln. Daraus kann man wiederum die Geschwindigkeitskonstanten der in Abbildung 1 dargestellten Teilprozesse Adsorption (Bindung an den Boden), Desorption (Ablösung vom Boden) und Zersetzung berechnen. Abbildung 2 zeigt beispielhaft die Enrofloxacin-Daten aus den Gefäßversuchen und die errechnete Abbaukurve. Auch wenn die Eignung des Abbaugesetzes nur an Daten aus Gefäßversuchen erprobt wurde, kann man davon ausgehen, dass es vermutlich auch auf Freilandprozesse anwendbar ist und Gültigkeit für weitere Substanzen besitzt.

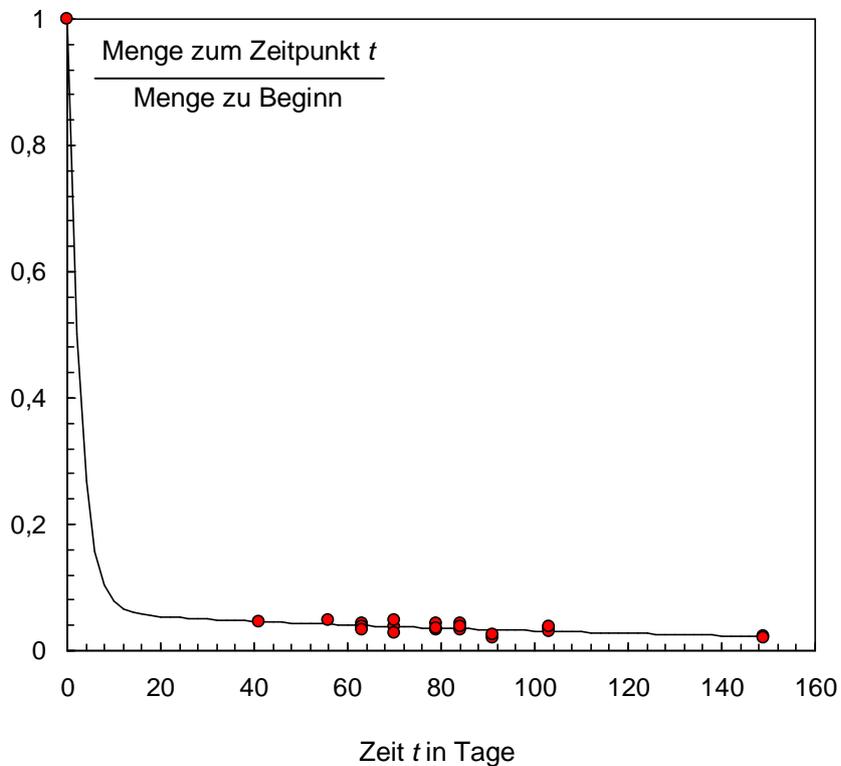


Abbildung 2: Abbaukurve von Enrofloxacin

# **Zwischenbericht**

zum Forschungsprojekt

**Transfer von Arzneimittelrückständen  
in Böden und Pflanzen über Wirt-  
schaftsdünger tierischer Herkunft**

durchgeführt am

LTZ Augustenberg und CVUA Karlsruhe

2009

# Inhaltsverzeichnis

1	Ziel.....	3
2	Projektrahmen 2008 .....	3
3	Vorversuche 2007.....	3
4	Durchführung.....	4
4.1	Dotierung der Wirkstoffe.....	4
4.2	Versuchsablauf - LTZ Augustenberg.....	6
4.3	Trocknungsversuch .....	7
4.4	Methodenentwicklung.....	8
4.4.1	Enrofloxacin.....	9
4.4.2	Tetracyclin.....	11
5	Untersuchungsmethoden.....	11
5.1	Bestimmung von Enrofloxacin .....	11
5.1.1	Pflanze und Korn (Mais).....	11
5.1.2	Boden.....	12
5.2	Bestimmung von Tetracyclin.....	12
5.2.1	Pflanze und Korn (Mais).....	12
5.2.2	Boden.....	13
6	Erste Ergebnisse .....	13
6.1	Ertragsstudie .....	13
6.1.1	Feldversuch mit Körnermais.....	13
6.1.2	Gefäßversuch mit Mais.....	14
6.2	Tetracyclin .....	15
6.2.1	Messergebnisse - Pflanzenproben .....	15
6.2.2	Messergebnisse - Bodenproben.....	16
6.2.3	Leistungsmerkmale.....	19
6.3	Enrofloxacin.....	20
6.3.1	Messergebnisse - Pflanzenproben .....	20
6.3.2	Messergebnisse - Bodenproben.....	20
6.3.3	Leistungsmerkmale .....	21
7	Diskussion .....	21
8	Ausblick .....	22
9	Literatur .....	23

## 1 Ziel

In der Gesellschaft wird zunehmend über eine mögliche Umweltbelastung durch Rückstände von Arzneimitteln diskutiert. Dabei wird nicht nur der Eintrag von Humanarzneimitteln, sondern zunehmend auch der von Tierarzneimitteln im Zuge einer Ausbringung von Wirtschaftsdüngern untersucht und betrachtet. Hierdurch werden unkontrollierte Stoffeinträge in Böden und möglicherweise in das Grundwasser befürchtet.

In einem gemeinsamen Projekt des LTZ Augustenberg und des CVUA Karlsruhe wird das Verhalten möglicher Rückständen zweier wichtiger Tierarzneimittel unter praxisrelevanten Bedingungen untersucht. Dazu werden Versuche zur Aufnahme der Antibiotika Tetracyclin und Enrofloxacin durch die Pflanze nach einer Gülledüngung unter Zugabe der Prüfsubstanzen durchgeführt. Analysen sollen klären, ob es mit praxisrelevanten Antibiotikakonzentrationen in der Gülle überhaupt zu nennenswerten Rückständen in Pflanzen oder Boden kommt. Bei relevanten Rückständen in den praxisnahen Feldversuchen bzw. den *in vitro*-Versuchen im Gewächshaus könnten Analysen der Pflanzen- und Bodenproben eine bilanzierte Beurteilung der Gefährdung durch Antibiotikarückstände in Pflanzen und/oder Boden ermöglichen.

## 2 Projektrahmen 2008

Im ersten Projektjahr dieses Forschungsvorhabens hat das LTZ Augustenberg Freilandversuche und Modelversuche im Gewächshaus mit Körnermais durchgeführt. Als zu prüfende Antibiotika wurden die Wirkstoffe Tetracyclin und Enrofloxacin ausgewählt. Tetracyclin wurde ausgewählt, da es als das in der Tiermedizin am häufigsten eingesetzte Antibiotikum gilt. In Folge der in der Schweinemast eingesetzten Wirkstoffmenge erscheint ein Eintrag von Tetracyclin über die Gülle am wahrscheinlichsten.

Enrofloxacin gehört zu der neuen hochwirksamen Antibiotikagruppe der Chinolone. Im Tierkörper wird Enrofloxacin zum Ciprofloxacin umgebaut, das auch in der Humanmedizin eingesetzt wird. Die Resistenzlage ist derzeit noch gut, daher hat die Antibiotikagruppe der Chinolone eine besondere Bedeutung.

Am CVUA Karlsruhe wurden Analysemethoden für die zu erwartenden Rückstandskonzentrationen nach einem praxisnahen Eintrag der Wirkstoffe über den Wirtschaftsdünger entwickelt. Um die Matrices vegetative und generative Pflanzenteile sowie Bodenproben auf Wirkstoffrückstände untersuchen zu können, mussten verschiedene Analysemethoden entwickelt und optimiert werden. Die Proben aus den Versuchen des LTZ wurden untersucht und die Ergebnisse können im vorliegenden Zwischenbericht für eine vorläufige Beurteilung herangezogen werden.

## 3 Vorversuche 2007

Im Rahmen von Vorversuchen 2007 mit Grünmais und Wintergerste am LTZ Augustenberg wurde zusammen mit dem CVUA Karlsruhe der Übergang der Arzneimittel Chlortetracyclin und Sulfadimidin untersucht (TÖPPER ET AL. 2008). Die in diesem Modellversuch verwendeten Konzentrationen entsprachen einem „worst case“ Szenario, da die Zufuhr im Rahmen der üblichen Düngung mit Konzentrationen erfolgte, die einer dauerhaften Behandlung aller Tiere eines Bestandes ohne jegliche Verdünnungen entsprechen würden (900 mg/L Urin). Derartige Konzentrationen kommen in der Praxis nicht vor.

Die Daten dieser Vorversuche lassen trotz Einschränkungen wie zu hohe Wirkstoffkonzentrationen, Ansatz von nur zwei echten Parallelen und nicht zufriedenstellende Wiederfindungsraten bei der Analytik erste Tendenzen erkennen.

Durch die in den Pflanzen und Böden nachgewiesenen Rückstandskonzentrationen wurde folgendes angezeigt:

1.) Prinzipiell ist es möglich, dass die von den Tieren ausgeschiedenen Arzneimittel sowie deren Rückstände nach einer Düngungsmaßnahme mit Gülle auch zu Rückständen in Pflanzen führen können.

2.) Auf Grund der besseren Diffusions- bzw. Bindungsfähigkeit des Sulfadimidins kommt es zu höheren Konzentrationen in der Pflanze und in den tieferen Bodenschichten als bei Chlor-tetracyclin.

3.) In Folge unterschiedlichen Wachstumsverhaltens verschiedener landwirtschaftlicher Nutzpflanzen kommt es auch zu unterschiedlichen Rückstandskonzentrationen.

Bei der Verlagerung von Arzneimittelrückständen über die Gülle in den Boden und der Aufnahme in die Pflanzen handelt es sich um komplexe Vorgänge. Hierbei spielen das chemische Verhalten der Wirkstoffe, das Wachstumsverhalten sowie das Stoffaufnahmevermögen der Pflanzen sowie Zeitpunkt und Dauer der Kontamination eine große Rolle.

## 4 Durchführung

Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den Vorversuchen unter Praxisbedingungen zu untersuchen, wurden Feldversuche unter realistischen Bedingungen mit zeitgleichen Modellversuchen im Gewächshaus durchgeführt. Im Gegensatz zu den Vorversuchen wurden nun verschiedene - auch der landwirtschaftlichen Praxis entsprechende - Wirkstoffkonzentrationen im Rahmen der Gülledüngung appliziert (siehe Kap. 4.1). Eine erhöhte Konzentration (worst case) sollte die Belastungsgrenze von Boden und Pflanze darstellen. Mit einer in der Praxis zu erwartenden Konzentration (bedingt durch Verdünnungseffekte) soll die Rückstandssituation dargestellt werden. Eine zwischen der maximalen und in der Praxis zu erwartenden Konzentration liegende Variante wird für statistische und kinetische Untersuchungen herangezogen.

### 4.1 Dotierung der Wirkstoffe

Um die in den Versuchen verwendete Schweinegülle mit den Prüfkonzentrationen ausbringen zu können, musste zunächst die Grundbelastung der Versuchsgülle bestimmt werden. Danach wurden die zu prüfenden Antibiotika in den jeweiligen Mengen zugemischt. Chinolone waren in der Gülle nicht nachweisbar. Tetracyclin wurde jedoch in einer Konzentrationen von 320 µg/kg nachgewiesen. Bei der Dotierung der Schweinegülle wurde dieser Gehalt entsprechend berücksichtigt.

Zur Abschätzung der Dotierungskonzentration wurde von einer 6 monatigen Mastdauer (ca. 180 Tage) ausgegangen und ein Mastendgewicht von 110-120 kg unterstellt. Da die Gewichtszunahme nicht linear erfolgt und sich die Futter- und Wasseraufnahme ebenso verhalten, wurde zur Abschätzung des durchschnittlichen Wasserverbrauchs von einem mittleren Körpergewicht von 50 kg ausgegangen.

Nach dem in Tabelle 1 aufgeführten Wasserbedarf eines Mastschweins für ein Gewicht von ca. 50 kg ergibt sich ein täglicher Bedarf von 5,7 L pro Tier, was eine Güllemenge von 1026 L für 180 Tage Mastdauer ergibt. Da der Wassergehalt des Futters positiv, die Wasserverdunstung aus der Gülle jedoch negativ zur Bilanz der Trinkwasseraufnahme und somit zur Gülleproduktion beitragen, wurde dies bei der kalkulatorischen Berechnung vernachlässigt.

Gewicht [kg]	Wasserbedarf [L/d]
20	2,5
50	5,7
100	8,5

Für **Tetracycline** beträgt die Tagesdosis 20 mg/kg Körpergewicht für eine Behandlungsdauer von 2-3 Tage. Bei einer einmaligen Behandlung über 2 Tage zur Einstallprophylaxe (25 kg Körpergewicht) ergibt sich daraus eine applizierte Menge von 1 g Tetracyclin pro Tier, dies

würde einer GülleKonzentration von 1mg/L entsprechen. Bei unvermeidbarer Verdünnung zum Beispiel durch die nicht ganz leere GülleKammer (es verbleibt üblicherweise 1/3 der Gülle in der Kammer) ergibt sich eine Tetracyclinkonzentration von 0,3 mg/L Gülle für die Verhältnisse unter Praxisbedingungen.

Wie sich bei von diesem Forschungsvorhaben unabhängigen Untersuchungen verschiedener Rinder- und Schweinegüllen aus konventioneller Viehhaltung gezeigt hat, entspricht die in der durchgeführten Kalkulation festgesetzte Antibiotikamenge den Praxisbedingungen (Tabelle 2). In Schweinegülle wurden Tetracyclinkonzentrationen von 0,08 - 0,5 mg/kg Frischmasse nachgewiesen. In der Literatur werden ähnliche Tetracyclinkonzentrationen angegeben, wobei sogar Maximalkonzentrationen von bis zu 2 mg/kg Frischmasse bestimmt wurden (SATTELBERGER ET AL. 2005).

**Tabelle 2: Konzentration an Tetracyclin und Chlortetracyclin in Gülle aus konventioneller Viehhaltung**

Bezeichnung	c(Tetracyclin) [mg/kg FM]	c(Chlortetracyclin) [mg/kg FM]	Literatur
Rindergülle	n.n.	n.n.	eigene Untersuchungen
Schweinegülle	0,1	62	eigene Untersuchungen
Schweinegülle	0,5	n.n.	eigene Untersuchungen
Schweinegülle	-	100	CHRISTIAN ET AL., 2003
Schweinegülle	0,01-1,9	0,05-3,7	SATTELBERGER ET AL. 2005

n.n. - nicht nachweisbar

Für ein „worst case“ Szenario kann von einer dreimaligen Behandlung der Tiere - wie in Tabelle 3 angegeben - ausgegangen werden. Aus der Summe dieser Behandlungen ergibt sich eine Tetracyclingabe von 7 g/Tier über die gesamte Mastdauer. Für die „worst case“ Verhältnisse im Versuch wurde die Gülle daher mit einer erhöhten Konzentration von 7 mg/L Tetracyclin dotiert. Als mittlere Konzentration wurde 2 mg/L Gülle gewählt.

**Tabelle 3: „worst case“ Szenario einer Behandlung mit Tetracyclin und Enrofloxacin**

Nr.	Behandlungsgrund	Körpergewicht [kg]	Tetracyclin Dosis [g/Tier]	Enrofloxacin Dosis [g/Tier]
1	Einstallprophylaxe	25	1	0,125
2	Erkrankung während der Mast	50	2	0,25
3	Erkrankung kurz vor Mastende	100	4	0,5
<b>Summe</b>			<b>7</b>	<b>0,875</b>

Für **Enrofloxacin** beträgt die Tagesdosis für Schweine 2,5 mg/kg Körpergewicht. Eine Einstallprophylaxe mit Enrofloxacin ist derzeit auf Grund des hohen Preises zwar unwahrscheinlich, wurde aber trotzdem in die Berechnung mit einbezogen. Bei einer einmaligen Behandlung über 2 Tage und 25 kg Körpergewicht würde eine Menge von 125 mg Enrofloxacin je Tier appliziert werden. Das entspräche einer GülleKonzentration von 0,05 mg/L unter Praxisbedingungen, wobei eine Verdünnung im Falle einer nicht vollständig entleerten GülleKammer bereits berücksichtigt ist.

Auch für Enrofloxacin ist in Tabelle 3 die Dosierung eines „worst case“ Szenarios mit Einstallprophylaxe und zwei Erkrankungen dargestellt. Aus der Summe der Enrofloxacin dosierungen ergibt sich eine Behandlung mit ca. 900 mg pro Tier. Dies entspräche einer GülleKonzentration von 0,9 mg/L, wobei die Metabolisierung in Ciprofloxacin unberücksichtigt bleibt

(1/8 der Enrofloxacin-Konzentration wird normaler Weise im Tierkörper in Ciprofloxacin metabolisiert). Für die erhöhte Konzentration eines „worst case“ Szenarios werden demnach 1 mg/L Gülle veranschlagt. Bei der Variante mit mittlerer Enrofloxacin-Konzentration wurden 0,5 mg/L Gülle dotiert.

Die Varianten - Güllidotierungen beider Wirkstoffe und die theoretisch resultierenden Bodenkonzentrationen im Feld- und Modelversuch - sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4: Wirkstoffdotierungen in Gülle und berechnete Bodenkonzentration im Feldversuch (Parzelle von 3 x 12 m; 20 cm Tiefe) und im Modelversuch für Tetracyclin (TC) und Enrofloxacin (Enro)**

Versuch	Güllidotierung		theoretische Wirkstoffkonzentration im Boden			
			Feldversuch		Modelversuch	
Konzentration c	c(TC) [mg/L]	c(Enro) [mg/L]	c(TC)Boden [µg/kg TS]	c(Enro)Boden [µg/kg TS]	c(TC)Boden [µg/kg TS]	c(Enro)Boden [µg/kg TS]
praxisrelevant	0,3	0,05	5	0,8	8	0,13
mittel	2	0,5	33	8	53	13
erhöht	7	1	116	16	187	26

## 4.2 Versuchsaufbau - LTZ Augustenberg

Im Versuchsjahr 2008 wurden Feld- und Vegetationsversuche - letztere in sog. Kick-Brauckmann-Gefäßen - im Vegetationshaus des LTZ mit Körnermais durchgeführt. Die Prüfsubstanzen Tetracyclin und Enrofloxacin wurden in Wasser suspendiert (nur im Gefäßversuch!) bzw. zu einer als Wirtschaftsdünger eingesetzten Schweinegülle in 3 verschiedenen Konzentrationen zudosiert und im Rahmen einer praxisüblichen Düngungsmaßnahme ausgebracht. Im Feldversuch wurde hierzu die Gülle zur 1. N-Gabe vor der Saat von Hand gleichmäßig auf der Versuchsfläche verteilt und zeitnah eingearbeitet. Im Gefäßversuch wurde die entsprechende Güllmenge zum Versuchsansatz eingemischt. Im Verlauf der Vegetationsperiode wurden Boden- und Pflanzenproben im Gefäßversuch ab dem 4-6 Blatt Stadium wöchentlich und zur Abschlussernte bzw. im Feldversuch im 4-6 Blatt Stadium, zum Rispen-schieben und zur Kornernte entnommen, die Frisch- und Trockensubstanzerträge der pflanzlichen Aufwüchse sowie die TS-Gehalte der Bodenproben ermittelt und Tetracyclin- sowie Enrofloxacin-Rückstände in den Boden- und Pflanzenproben bestimmt.

Die im Feldversuch verabreichte Güllgabe richtet sich vornehmlich nach dem Stickstoffbedarf der jeweiligen Kulturpflanze in Abhängigkeit von Ertragsersparung und Standortbedingungen wie Wasserversorgung, Bodenfruchtbarkeit und Fruchtfolge und kann n. DüV max. 170 kg N/ha betragen. Da die in den Versuchen 2008 verwendete Schweinegülle unerwartet geringe Mengen an Stickstoff (0,29% FM, siehe Tabelle 5) enthielt, wurde die N-Düngung in 2 Teilgaben in Form der Gülle (70 kg N/ha zur Maissaat) und mineralisch (4-6 Blatt Stadium) verabreicht.

**Tabelle 5: Inhaltsstoffe der Schweinegülle in den Versuchen 2008**

 Baden-Württemberg LANDWIRTSCHAFTLICHES TECHNOLOGIEZENTRUM AUGUSTENBERG Standort Karlsruhe					
Prüfbericht-Nr.:	080167-2				Seite 2 von 2
Betreff:	Untersuchung von Gülleproben				
Probenart:	Gülle	Probenbez.:	Schweinegülle		
Proben-Nr.:	A 080374				
Becker, Rüppurr					
Parameter	Verfahren	Messwert IFS	Messwert ITS	Dim.	Bestim.-grenze
Trockensubstanz	MB III 3.1 VDLUFA		6,8	%	
Gesamt-N (Kjeldahl)	MB III 4.1.1 VDLUFA (	0,29	4,2	%	0,050
Ammonium-N (NH <sub>4</sub> N)	DIN 38406 (angelehn	0,18	2,6	%	
Kalium (K <sub>2</sub> O)	DIN 38406 E 22	0,62	9,2	%	
Magnesium (MgO)	Meth.- Buch VDLUFA	0,14	2,1	%	
Phosphor (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	DIN 38406 E 22	0,342	5,02	%	
Seuchenhygiene (Salmonellen) <sup>1</sup>	BGK V 1.3	0		in 1 ml	

Im Gefäßversuch wurden ebenfalls 50% des N-Bedarfs als Gülle adäquat zum Feldversuch zum Versuchsansatz ausgebracht und eingemischt. Der fehlende Stickstoff wurde zum 4-6 Blatt Stadium der Maispflanzen mineralisch ergänzt. Somit waren die Versuchsreihen hinsichtlich Höhe und Form der Düngung vergleichbar. Zusätzlich zu den Varianten mit Antibiotika zu Schweinegülle wurde im Gefäßversuch eine Versuchsreihe mit den zu prüfenden Antibiotika in Wasser suspendiert angesetzt, um die Einflüsse der organischen Substanz der Gülle auf Verfügbarkeit, Abbau- und Aufnahmeverhalten der Antibiotika zu prüfen.

Zu den festgelegten Probenahmeterminen wurden jeweils Pflanzen- und Bodenproben entnommen. Letztere im Feldversuch zu allen Terminen jeweils in 2 Schichten von 0 - 5 cm und 6 - 20 cm; im Gefäßversuch erfolgte eine schichtweise Beprobung nur zur abschließenden Ganzpflanzen- bzw. Kornernte. Die Pflanzenproben wurden ab dem Termin „Rispen schieben“ differenziert nach vegetativen und generativen Organen getrennt beprobt. Um die Verluste an Antibiotika-Wirkstoffen möglichst gering zu halten und eine mögliche „Verschleierung“ der Wirkstoffe für die nachfolgende, sehr aufwändige Analytik auszuschließen, wurden die Boden- und Pflanzenproben bei 40°C schonend getrocknet, vermahlen und bis zur Analyse in lichtdichten Gefäßen kühl aufbewahrt.

### 4.3 Trocknungsversuch

Vor der Analyse am CVUA Karlsruhe wurden die Proben zur Lagerung getrocknet und vermahlen. Hierbei wurden am LTZ Augustenberg die Trockensubstanzgehalte der Boden- und Pflanzenproben gravimetrisch bestimmt. Üblicherweise wird die Trockensubstanz durch Trocknung bei 105°C ermittelt. Um das best mögliche Trocknungsverfahren zu ermitteln, wurden die thermische Stabilität der beiden Wirkstoffe und die Veränderung der Pflanzenmatrix anhand von Trocknungsversuchen bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Zunächst wurde der Einfluss der getrockneten Matrix auf die Analytik anhand von Routineproben von Versuchen am LTZ bestimmt. Dazu wurden Proben bei 105°C, 40°C und durch Gefriertrocknung behandelt.

Alle drei Versuchsansätze wurden am CVUA Karlsruhe mit der laborüblichen Methode für Tetracycline in Lebensmittel untersucht. In Abbildung 1 sind die Chromatogramme für Mais-

pflanzen mit unterschiedlichen Trocknungstemperaturen abgebildet. Dabei ist der große Matrixeinfluss bei Pflanzen die mit 105°C getrocknet wurden deutlich zu erkennen. Da die Tetracycline schon bei einer Retentionszeit von 9 bis 12 Minuten eluieren, ist eine Trocknung bei 105°C oder 40°C möglich. Die Chromatogramme der Trocknungsversuche bei erhöhten Temperaturen sind sich in diesem Retentionszeitfenster sehr ähnlich und könnten beide für die weiteren Messungen verwendet werden. Aus praktischen Gründen wird die Trocknung bei 40°C bevorzugt, da es zum Einen die apparatur- und kostengünstigere Methode ist und zum Anderen das Probenmaterial bei der Vorbereitung leichter zu handhaben ist. Das gefriergetrocknete Material neigt zur statischen Aufladung. Die Extraktion gefriergetrockneter Proben bedarf aufgrund schlechter Benetzbarkeit des Materials größerer Mengen an Lösungsmittel.

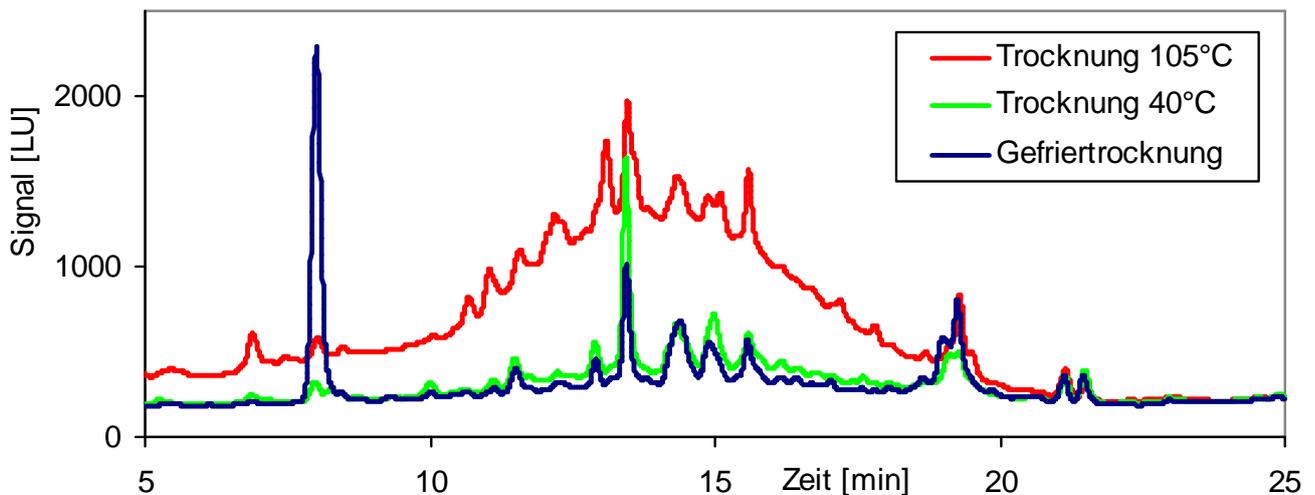


Abbildung 1: HPLC-FLD Chromatogramm für die Matrix Mais (ganze Pflanze) bei unterschiedlichen Trocknungstemperaturen

Um die thermische Stabilität von Tetracyclin und Enrofloxacin zu untersuchen, wurden am CVUA Karlsruhe Laborversuche durchgeführt. Dazu wurde undotiertes Pflanzenmaterial von Mais angefeuchtet und mit 1000 µg/kg eines Wirkstoffes homogenisiert. Je eine Teilprobe wurde im Trockenschrank bei 105°C und eine bei 40°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Proben wurden auf ihre Gehalte an Enrofloxacin bzw. Tetracyclin untersucht und die Wiederfindungen ermittelt. Während es für Tetracyclin bei einer Trocknung bei 105°C zu deutlichen Verlusten kam (35%), sind bei 40°C keine Verluste an Tetracyclin zu erkennen (100%). Daher ist davon auszugehen, dass die Wiederfindungsrate für Tetracyclin durch eine Trocknung bei 40°C nicht beeinflusst wird. Für die Trocknungsversuche mit Enrofloxacin konnten keine Unterschiede zwischen 105°C und 40°C festgestellt werden. Für die weitere Probenvorbereitung am LTZ Augustenberg wurden daher alle Pflanzen-, Getreide- und Bodenproben bei 40°C getrocknet.

#### 4.4 Methodenentwicklung

Ein Analysengang besteht im allgemeinen aus den Arbeitsschritten Extraktion, Aufreinigung und Messung. Bei der Extraktion wird die Probe mit einem geeigneten Lösungsmittel versetzt, um möglichst selektiv die zu bestimmenden Analyten in Lösung zu bringen. Dabei ist die Wahl des Lösungsmittels abhängig von den Lösungseigenschaften des Analyten und der sogenannten Matrix. Ziel ist es, einen möglichst großen Anteil des Analyten im Lösungsmittel zu lösen und gleichzeitig möglichst wenig Matrixbestandteile in das Lösungsmittel zu überführen.

Der zweite Schritt ist die Aufreinigung des Extraktes. Die Matrixbestandteile, die sich mit dem gesuchten Analyten im Lösungsmittel gelöst haben, müssen so gut wie möglich hiervon wieder abgetrennt werden.

Der dritte Teil einer Analysenmethode umfasst die chromatographische Trennung der Analyten von den Matrixbestandteilen und die Detektion (z.B. UV-Spektrum, Fluoreszenz oder Molekülmasse) der Analyten. Im Folgenden wird beispielhaft die Methodenentwicklung für Enrofloxacin in Mais (ganze Pflanze) dargestellt.

#### 4.4.1 Enrofloxacin

##### *Extraktion*

Um verschiedene Extraktionsverfahren testen zu können, wurde zunächst ein robustes Messsystem gesucht, mit dem man möglichst ohne weitere Aufreinigungsschritte die stark matrixbelasteten Extrakte analysieren kann. Da Tetracyclin und Enrofloxacin zu den Antibiotika gehören, bietet sich der allgemeine Hemmstofftest an. Mit der Wachstumshemmung der Bakterien kann über die Größe des sogenannten Hemmhofs die aus der Matrix mit den verschiedenen Lösungsmitteln extrahierten Analytmenge abgeschätzt werden. Unter Berücksichtigung der hemmenden Eigenwirkung der Lösungsmittel, wurden Extraktionsversuche mit dotierter Matrix und unterschiedlichen Lösungsmitteln durchgeführt und anhand der Hemmhöfe für die einzelnen Extrakte die geeigneten Lösungsmittel ausgewählt. Um in Frage kommende Lösungsmittel auswählen zu können, wurden die Hemmhöfe der Proben-

**Tabelle 9: Wiederfindungsraten (WDF) der hemmenden Wirkung von Enrofloxacin in Mais (ganze Pflanze) nach Extraktion mit unterschiedlichen Lösungsmitteln**

Lösungsmittel	Hemmhof WDF [%]
Dichlormethan	73
Aceton+1% Essigsäure	70
Methanol:Ammoniak (75:25)	67
Aceton:Ammoniak:Wasser (50:25:25)	67
Methanol:Ammoniak:Wasser (50:25:25)	67
Acetonitril:Ammoniak:Wasser (50:25:25)	67
Aceton	67
Ammoniak (2%)	67
Chloroform	67
N,N-Dimethylformamid	67
Methanol	53
Methanol+14%ige NaCl-Lösung (5+1)	53
Acetonitril	40
Aceton+1% Ammoniak	40

extrakte mit den Hemmhöfen eines Standards gleicher Konzentration (100% ige Wiederfindung) verglichen. In Tabelle 9 ist eine Rangliste der geeigneten Extraktionsmittel für Enrofloxacin zusammengestellt. Danach sind Dichlormethan und Aceton mit 1% Essigsäure die am besten geeigneten Extraktionsmittel, wobei die nachfolgend aufgeführten Lösungsmittel als Alternative für eine Extraktion von Enrofloxacin aus Mais (ganze Pflanze) zur Verfügung stehen würden. Bei der Extraktion mit wässrigen Lösungsmitteln hat sich gezeigt, dass ein zu hoher Matrixanteil mitextrahiert wird, der die nachfolgende Reinigung erschwert.

Für den weiteren Verlauf der Methodenentwicklung wurde „Aceton mit 1% Essigsäure“ als Extraktionsmittel gewählt, da die Bearbeitung derartiger Extrakte zur Aufreinigung mit einer hohen Ausbeute bei geringem Anteil an Matrixbestandteilen optimal ist.

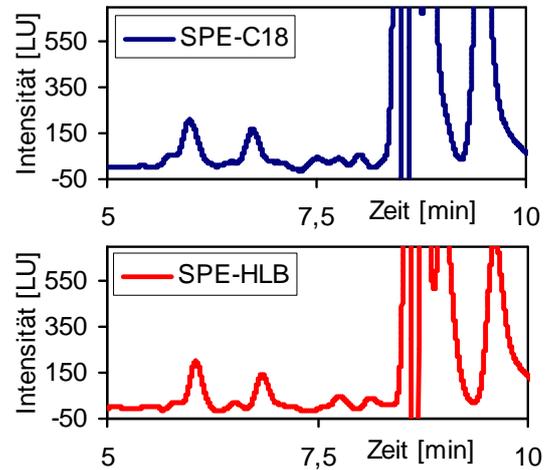
##### *Aufreinigung*

Um eine möglichst effektive Aufreinigung durchführen zu können, sollten in einem Vorreinigungsschritt mit einem stark organischen Lösungsmittel (unpolar) die stark lipophilen Anteile aus dem Extrakt entfernt werden. Dazu wird die Acetonphase abgeblasen und der Rückstand in Phosphatpuffer (pH 7,4) aufgenommen. Der Extrakt in der wässrigen Phase wird mit Hexan gewaschen, um unpolare Matrixbestandteile abzutrennen.

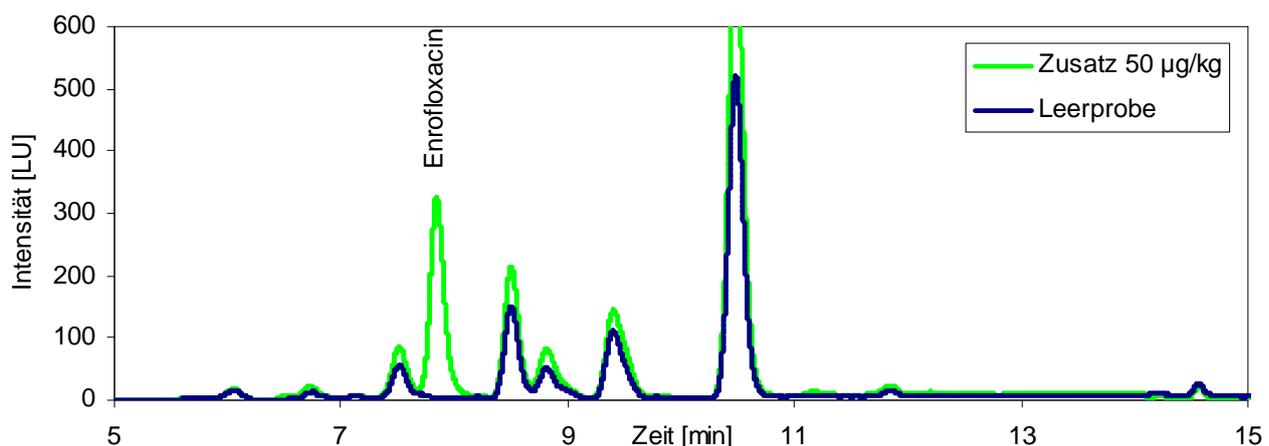
Als nächstes wurde die Aufreinigung mittels Festphasenextraktion (SPE - solid phase extraction) an unterschiedlichen Phasen getestet. Für polare Verbindungen wie Enrofloxacin bieten

sich üblicher Weise zwei Phasen an, octadecylsilyliertes Kieselgel (C18) oder die Polymerphase mit hydrophilen und lipophilen Gruppen im Gleichgewicht (HLB - hydrophilic-lipophilic balance). Beide Phasen wurden getestet und die Chromatogramme der Maismatrix miteinander verglichen. Abbildung 2 lässt erkennen dass sich die Chromatogramme nach SPE an C18 oder an HLB Material kaum unterscheiden. In beiden Fällen wird viel Matrix auf die analytische Säule geladen, die in Form sehr hoher Peaks bei einer Retentionszeit von 9 bis 10 Minuten zu erkennen ist. Enrofloxacin eluiert bei beiden Messungen bei 8 Minuten. Mit der SPE-Aufarbeitung mit lipophilen Phasen ließ sich keine ausreichende Aufreinigung erreichen.

In weiteren Versuchen mit SPE wurden Ionenaustauscherphasen getestet. Sowohl schwache, als auch starke Anionen- und Kationenaustauscher waren für die Aufreinigung der Maisextrakte nicht zufriedenstellend (Daten nicht dargestellt). Insgesamt ist trotz der Vorreinigung mit Hexan die alleinige Aufreinigung mittels SPE für die Matrix Mais (ganze Pflanze) unzureichend. Eine weitere Möglichkeit der Aufreinigung stellt die flüssig-flüssig Extraktion dar. Chloroform als relativ polares Lösungsmittel bietet sich dafür an, die polaren Analyten aus der Matrix abzutrennen. Für die flüssig-flüssig Extraktion wird der wässrige Extrakt (nach Hexanextraktion) mit Chloroform extrahiert. Dabei gehen die Analyten in die Chloroformphase über und können mit dieser abgetrennt werden. In Abbildung 3 sind die Chromatogramme für Mais nach Chloroformextraktion dargestellt. Der Enrofloxacinpeak bei 7,8 Minuten ist deutlich von den noch verbliebenen Matrixpeaks getrennt. Vergleicht man das Chromatogramm der Chloroformaufreinigung mit denen der Festphasenextraktion in Abbildung 2, so ist eine deutlich geringere Matrixbelastung bei 9 bis 10 Minuten zu erkennen. Der Zusatz von 50 µg/kg Enrofloxacin konnte mit einer Wiederfindungsrate von 40% detektiert werden.



**Abb. 2: HPLC-FLD Chromatogramme für Maismatrix aufgearbeitet mit verschiedenen SPE Festphasen**



**Abbildung 3: HPLC-FLD Chromatogramme für Maismatrix nach Chloroformextraktion: Leerprobe und dotierte Probe (50 µg/kg Enrofloxacin)**

### Messung

Zur Messung der Chinolone mittels HPLC-FLD wurde die im Laborbereich für pharmakologisch wirksame Stoffe des CVUA Karlsruhe bereits etablierte Messmethode für tierische Lebensmittel auf die Matrix Mais-Grünpflanze, Mais-Korn und Boden angepasst. Dazu wurden

Versuche mit unterschiedlichen Säulenabmessungen, Säulenmaterialien, Lösungsmitteln und Lösungsmittelgradienten durchgeführt. Die Detektion mittels FLD wurde durch Anpassung der Detektorverstärkung optimiert.

Um Matrix unabhängiger messen zu können, wurde zusätzlich eine flüssigkeitschromatographische Methode mit massenspektrometrischer Detektion etabliert (LC-MS). Dazu wurde zunächst eine für die Massenspektrometrie angepasste HPLC-Methode entwickelt (im Gegensatz zu HPLC-FLD unter Verwendung von flüchtigen Puffern). Das Massenspektrometer wurde auf Enrofloxacin getuned, um eine maximale Ionisationsrate in der Quelle und Signalintensität im Detektor zu erreichen. Für die Quantifizierung wurden die intensivsten Sekundärionen nach Fragmentierung in der Kollisionszelle bestimmt.

Die optimierte Methode, die zur Bestimmung der EnrofloxacinKonzentrationen in Mais-Grünpflanzen und Mais-Körnern angewandt wurde, ist in Kapitel 5.1 aufgeführt.

#### **4.4.2 Tetracyclin**

Ähnlich dem Enrofloxacin wurde die Analysenmethode für Tetracyclin optimiert und an die Pflanzen- und Bodenmatrix angepasst. Zur Analytik von Tetracyclinrückständen aus Pflanzenmaterial wurde eine am CVUA Karlsruhe entwickelte Methode in Futtermitteln optimiert. Dabei zeigte sich, dass Tetracyclin in Pflanzenmaterial mit ausreichender Empfindlichkeit und Selektivität mittels HPLC-DAD bestimmt werden kann. Für die Analyse in Bodenproben hat sich die Methode von HAMSCHER ET AL. (2002) als praktikabel erwiesen. Bodenproben werden besser durch LC/MS-MS bestimmt, da auf diese Weise eine beachtliche Empfindlichkeitssteigerung beobachtet werden konnte.

Auch die Methode zur Bestimmung der Tetracycline ist in Kapitel 5.2 aufgeführt.

## **5 Untersuchungsmethoden**

Die Proben wurden am LTZ Augustenberg zerkleinert und bei 40°C getrocknet. Die getrockneten und gemahlene Proben wurden am CVUA Karlsruhe auf Rückstände von Enrofloxacin und Tetracyclin wie folgt untersucht.

Zu jeder Probenserie wurde zur Quantifizierung zeitgleich eine Matrixkalibrierung aufgearbeitet und vermessen. Dazu wurde Probenmaterial aus unbehandelten Versuchsvarianten mit Wirkstoffkonzentrationen im Bereich des zur erwartenden Befundes dotiert.

Die Matrix Pflanze verändert sich während der Kultivierung sehr stark und zeigte zu den verschiedenen Probenahmeterminen (4-6 Blatt Stadium, Rispschieben und Ernte) deutlich unterschiedliche Einflüsse auf die Analysenergebnisse. Um diese Matrixeffekte bei der Messung möglichst gering zu halten wurde für die Matrixkalibrierkurve immer unbelastetes Material passend zum Probenahmetermin aufgearbeitet.

### **5.1 Bestimmung von Enrofloxacin**

#### **5.1.1 Pflanze und Korn (Mais)**

Von der homogenisierten Probe (Maispflanze oder Maiskörner) wird 1 g eingewogen und mit Aceton und 1% Essigsäure extrahiert. Nachdem der Extrakt über Glaswolle dekantiert und bei 40°C mit Stickstoff zur Trockene abgeblasen wurde, wird der Rückstand in Phosphatpuffer (pH 7,4) aufgenommen. Danach wird der wässrige Extrakt mit Hexan gewaschen, wobei die organische Phase verworfen wird. Für die Chloroformextraktion wird der wässrige Extrakt zwei mal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroformphasen werden bei 40°C unter Stickstoff zur Trockene abgeblasen. Der Rückstand wird in HPLC- Eluent aufgenommen und für die HPLC-Messung ultrazentrifugiert.

Für die HPLC-FLD Messung werden die Analyten zunächst auf einer Purospher® RP-18 Säule (125 mm x 3 mm ID, 5 µm Partikelgröße) getrennt. Als Eluent A wird 0,02 M Phosphorsäu-

re (pH 3,0) und als Eluent B Methanol verwendet. Es werden 15 µL Probenextrakt injiziert und bei einem Fluss von 0,6 mL/min und einer Säulentemperatur von 40°C chromatographisch getrennt. Der HPLC-Gradient ist in Tabelle 10 dargestellt. Enrofloxacin wird im FLD bei einer Anregungswellenlänge von 288 nm und einer Messwellenlänge von 444 nm gemessen.

**Tab. 10: Gradientenprogramm für die HPLC-FLD Bestimmung von Enrofloxacin**

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,2	90	10
8	80	20
19	35	65
21	0	100
27	0	100
28	90	10
34	90	10

Für die LC-MS Messung an einer LCQ von Thermo® werden die Analyten auf einer Luna® C18 Säule (150 mm x 2 mm ID, 5 µm Partikelgröße) bei 40°C Säulentemperatur und einem Fluss von 0,4 mL/min getrennt. Für die Gradientenelution wird mit 90% Eluent A (0,1% Essigsäure) begonnen und in 15 Minuten auf 90 % Eluent B (Methanol mit 0,1% Essigsäure) erhöht. Dieses Eluentenverhältnis wird für 5 Minuten gehalten und danach wieder auf 10% Eluent B erniedrigt. Um die Ausgangsverhältnisse einzustellen, wird zwischen allen Läufen 10 Minuten umequilibriert. Für die Detektion werden die Analyten mit Elektrospray-Ionisation im positiven Modus ionisiert und mit einer Kollisionsenergie von 32% fragmentiert. Zur Quantifizierung werden zwei Massenübergänge herangezogen: 360 amu auf 244 amu und 360 amu auf 316 amu.

### 5.1.2 Boden

1 g der homogenisierten Probe wird in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 5 ml Aceton : Wasser : 4% igen Ammoniak (50:25:25 v/v) versetzt und mittels Ultraschallbad und Schüttelmaschine extrahiert. Nach Zentrifugation wird der Überstand in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen dekantiert. Die Extraktion wird mit weiteren 5 ml Aceton : Wasser : 4% igen Ammoniak (50:25:25 v/v) wiederholt und die gewonnenen Extrakt vereinigt. Nach Abblasen der organischen Lösungsmittel bei 40°C unter Stickstoff verbleibt ein wässriger Anteil von ca. 4-5 mL im Zentrifugenröhrchen, der mit 5 mL Phosphatpuffer (pH 7,4) versetzt wird. Der wässrige Extrakt wird zwei Mal mit 3 mL Chloroform extrahiert und die vereinigten Chloroformphasen werden unter Stickstoff zur Trockene abgeblasen. Der Rückstand wird in 0,1% ige Essigsäure aufgenommen und nach Ultrazentrifugation für die LC-MS-Messung eingesetzt (Messmethode siehe *Kapitel 5.1.1 Pflanze und Korn (Mais)*).

## 5.2 Bestimmung von Tetracyclin

### 5.2.1 Pflanze und Korn (Mais)

Zur Extraktion werden 5 g homogenisiertes Probenmaterial mit Bersteinsäureanhydridpuffer (pH 4,0) versetzt, extrahiert und zentrifugiert. Der filtrierte Überstand wird mit Hexan gewaschen. Für die Aufreinigung an einer chaltisierenden Sepharosesäule wird eine Chromatographiesäule mit chelatisierender Sepharose gefüllt und mit Kupfersulfatlösung beladen. Nachdem die Säule mit Bersteinsäureanhydridpuffer (pH 4,0) equilibriert wurde, wird der Probenextrakt auf die Säule gegeben. Nach Waschen der Säule mit Aqua dest. und Methanol werden die Analyten mit EDTA-Puffer eluiert. Zur Aufreinigung des so gewonnenen Probenextraktes wird eine Festphasenextraktion (SPE) an einer C18-Extraktionskartusche durchgeführt. Dazu wird die Kartusche mit Methanol und Aqua dest. konditioniert und der Probenextrakt aufgegeben. Nach Waschen der SPE Kartusche mit Aqua dest. werden die Wirkstoffe mit methanolischer Oxalsäure eluiert. Der Extrakt wird zur Trockene eingeeengt, wobei als Keeper Ethylenglykol/3-Mercapropionsäure in Methanol zugesetzt wird, um Verluste des Analyten zu verhindern.

Für die HPLC-DAD Messung werden die Analyten zunächst auf einer Luna<sup>®</sup> C18 Säule (250 mm x 2 mm ID, 5 µm Partikelgröße) getrennt. Als Eluent A wird 0,01 M Oxalsäure und als Eluent B Methanol verwendet. Es werden 20 µL Probenextrakt injiziert und bei einem Fluss von 0,3 mL/min und einer Säulentemperatur von 40°C chromatographisch getrennt. Der HPLC-Gradient ist in Tabelle 11 dargestellt. Tetracyclin wird mit einem Diodenarray Detektor (DAD) bei einer Wellenlänge von 360 nm und einer Referenzwellenlänge von 550 nm gemessen.

**Tab. 11: Gradientenprogramm für die HPLC-FLD Bestimmung von Tetracyclin**

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	95	5
5	90	10
18	55	45
19	5	95
26	5	95
29	95	5

**Tab. 12: Gradientenprogramm für LC-MS Messung von Tetracyclin**

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	95	5
5	90	10
18	55	45
19	10	90
21	10	90
23	95	5

Für die LC-MS Messung an einer TSQ von Thermo<sup>®</sup> werden die Analyten auf einer Luna<sup>®</sup> C18 Säule (150 mm x 2 mm ID, 5 µm Partikelgröße) bei 40°C Säulentemperatur und einem Fluss von 0,4 mL/min getrennt. Das Injektionsvolumen beträgt 40 µL. Für die Gradientenelution wird mit 95% Eluent A (0,1% Essigsäure) begonnen und der Anteil an Eluent B (Methanol) wie in Tabelle 12 angegeben verändert. Für die Detektion werden die Analyten mit Elektrospray-Ionisation im positiven Modus ionisiert und mit einer Kollisionsenergie von 17% fragmentiert. Zur Quantifizierung werden zwei Massenübergänge herangezogen: 445 amu auf 410 amu und 445 amu auf 427 amu.

## 5.2.2 Boden

Es wird 1 g Bodenprobe mit McIlvain-EDTA-Puffer (pH 4) versetzt und mit Ethylacetat extrahiert. Nach Zentrifugation wird der klare Überstand abgenommen und die Extraktion des Rückstandes mit Ethylacetat wiederholt. Die Ethylacetatextrakte werden nach Zentrifugation vereint und bei 40°C mit Stickstoff zur Trockene eingedunstet. Der Rückstand wird in 0,1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> aufgenommen, membranfiltriert und mittels LC-MS/MS analysiert.

Für die LC-MS/MS Messung wird die gleiche Methode verwendet, wie für Pflanzengrün- und Kornmaterial beschrieben.

## 6 Erste Ergebnisse

### 6.1 Ertragsstudie

#### 6.1.1 Feldversuch mit Körnermais

Nach Ausbringung der 1. N-Gabe in Form von Schweinegülle mit den im Versuchsplan festgelegten Antibiotika-Zusätzen in der 2. Aprildekade 2008 erfolgte zeitnah die Aussaat der Versuchsfrucht Mais. Die Pflege des Versuches sowie die 2. N-Gabe wurden routinemäßig der Kultur entsprechend vom Versuchsbetrieb des LTZ Augustenberg durchgeführt. Ebenso wurden die Boden- und Pflanzenproben nach Versuchsplan entnommen und weiter verarbeitet.

**Tabelle 6: Maiserträge [t TM/ha] im Feldversuch 2008**

Varianten	Ertrag [t TM/ha]				
	4-6 Blatt Stadium	Rispenschieben	Restpflanze	Korn	Gesamt-Pflanze
<b>Kontrolle</b>	<b>2,9</b>	<b>9,3</b>	<b>5,8</b>	<b>4,4</b>	<b>10,2</b>
Schweinegülle+Tetracyclin (praxisüblich)	2,3	9,7	5,4	4,2	9,6
Schweinegülle+Tetracyclin (max. Konzentration)	2,5	8,4	5,5	4,4	9,9
Schweinegülle+Enrofloxacin (praxisüblich)	2,4	8,8	5,4	4,9	10,3
Schweinegülle+Enrofloxacin (max. Konzentration)	2,4	8,4	5,2	4,2	9,4

In Tabelle 6 sind die Ertragsergebnisse des Feldversuches vom 4-6 Blatt Stadium bis zur Kornernte der Varianten mit aufdotierter Schweinegülle im Vergleich zur Kontrolle ohne Antibiotika-Zusatz dargestellt. Die Erträge der Varianten mit Antibiotika-Zugabe sind tendenziell etwas niedriger; jedoch können diese nicht signifikanten Ertragsunterschiede einer Antibiotika-Zugabe nicht zugeordnet werden. Dies ist zunächst nicht anders zu erwarten, da die Gülle breitflächig ausgebracht und gleichmäßig in die oberen 5 - 10 cm Boden eingemischt wurde. Somit werden die bereits sehr geringen Antibiotika-Mengen noch weiter verdünnt, wodurch eine Pflanzenaufnahme sehr niedrig ausfallen und somit nicht wachstumshemmend sein sollte. Die Pflanzenanalysen (siehe Kapitel 6 Erste Ergebnisse) bestätigen diese Annahme.

### 6.1.2 Gefäßversuch mit Mais

In einem Teilsegment des umfangreich angelegten Gefäßversuches wurden die Varianten mit einer mittleren Tetracyclin- bzw. Enrofloxacin-Konzentration in wässriger Suspension wie in Gülle eingemischt hinsichtlich ihrer Dynamik auch zur Pflanzenentwicklung geprüft.

**Tabelle 7: Maiserträge [g TM/Gefäß] im Versuch zur Dynamik von Antibiotika**

Variante		TS-Ertrag [g TM/Gefäß]					
		11-06	18-06	26-06	02-07	11-07	16-07
<b>wässrige Lösung</b>	Tetracyclin	3,2	5,1	29,3	66,5	108,1	135,1
	Enrofloxacin	3,4	10,2	25,3	45,3	79,1	133,1
<b>zu Gülle dotiert</b>	Tetracyclin	7,9	15,1	27,0	46,5	63,5	71,1
	Enrofloxacin	8,1	10,9	28,7	50,2	84,5	118,6

Hierzu wurden beginnend mit dem 4-6 Blatt Stadium (11-06) wöchentlich bis einschließlich Rispenschieben (16-07) Pflanzen- und Bodenproben entnommen. Der Ertragsverlauf ist in Tabelle 7 dargestellt. In der Variante „wässrige Lösung“ schwanken die Erträge anfänglich beim Vergleich der Antibiotika zum Teil sehr deutlich in beide Richtungen. Beim letzten Probenahmetermin sind die Erträge jedoch identisch. Anders sieht es in der Variante „zu Gülle dotiert“ aus. Hier entwickeln sich - nach gutem, vergleichbarem Start - die mit Tetracyclin beaufschlagten Pflanzen signifikant schwächer bis einschließlich zur letzten Teilernte. Diese Unterschiede können verschiedene Ursachen haben. Ertrags unwirksam wird eine Aufnahme der Antibiotika sein, da in der Reihe mit Enrofloxacin dieser Effekt nicht feststellbar war. Eher vorstellbar ist ein hemmender Einfluss von Tetracyclin auf bodenbiologische Abläufe, wodurch die Nährstoffversorgung der Pflanzen - insbesondere mit Stickstoff, aber auch mit Phosphor und Schwefel - nicht immer optimal gewesen sein könnte. Diese bodenbiologische Komponente spielt besonders bei einer organisch-mineralischen Düngung beispielsweise mit Gülle eine wichtige Rolle.

**Tabelle 8: Maiserträge [g TM/Gefäß] zum Versuchsende**

Variante	Wirkstoff	Ertrag [g TM/Gefäß]	
		CCM	Korn
Kontrolle		200,1	134,4
	<b>Tetracyclin</b>		
W-T1	[0,3 mg/L Wasser]	196,3	138,9
W-T2	[2,0 mg/L Wasser]	175,2	130,6
W-T3	[7,0 mg/L Wasser]	199,5	135,6
	<b>Enrofloxacin</b>		
W-E1	[0,05 mg/L Wasser]	189,0	136,5
W-E2	[0,5 mg/L Wasser]	193,8	134,7
W-E3	[1,0 mg/L Wasser]	186,1	136,4
Kontrolle		138,3	106,2
	<b>Tetracyclin</b>		
G-T1	[0,3 mg/L Wasser]	128,9	96,2
G-T2	[2,0 mg/L Wasser]	126,3	88,6
G-T3	[7,0 mg/L Wasser]	131,5	94,6
	<b>Enrofloxacin</b>		
G-E1	[0,05 mg/L Wasser]	125,8	93,3
G-E2	[0,5 mg/L Wasser]	122,7	87,0
G-E3	[1,0 mg/L Wasser]	128,1	86,7

In einem weiteren Versuchsblock wurden die zu prüfenden Antibiotika in je 3 verschiedenen Konzentrationen sowohl in wässriger Suspension, als auch zu Schweinegülle dotiert (s. Feldversuch) geprüft (Tabelle 8). Die Erträge - sowohl CCM (= Corn Cob Mix) wie Körner - waren erwartungsgemäß im Block mit „wässriger Suspension“ (W-T1 bis W-E3) in Folge ausschließlicher mineralischer N-Düngung signifikant höher als im Block „Düngung mit dotierter Schweinegülle“. Innerhalb der jeweiligen Antibiotika-Varianten waren die Erträge in beiden Fällen mit wenigen Ausnahmen gleich. Ausreißertests ergaben keinen signifikanten Unterschied. Somit kann postuliert werden, dass eine Antibiotika-Zugabe - ob in wässriger Suspension oder zu Gülle - keinen nachteiligen Einfluss auf die Ertragsbildung von Mais gezeigt hat. Zur abschließenden CCM- bzw. Kornernte waren die im Stadium „Rispschieben“ beobachteten niedrigeren Erträge im Falle einer Behandlung mit Tetracyclin nicht mehr feststellbar.

## 6.2 Tetracyclin

### 6.2.1 Messergebnisse - Pflanzenproben

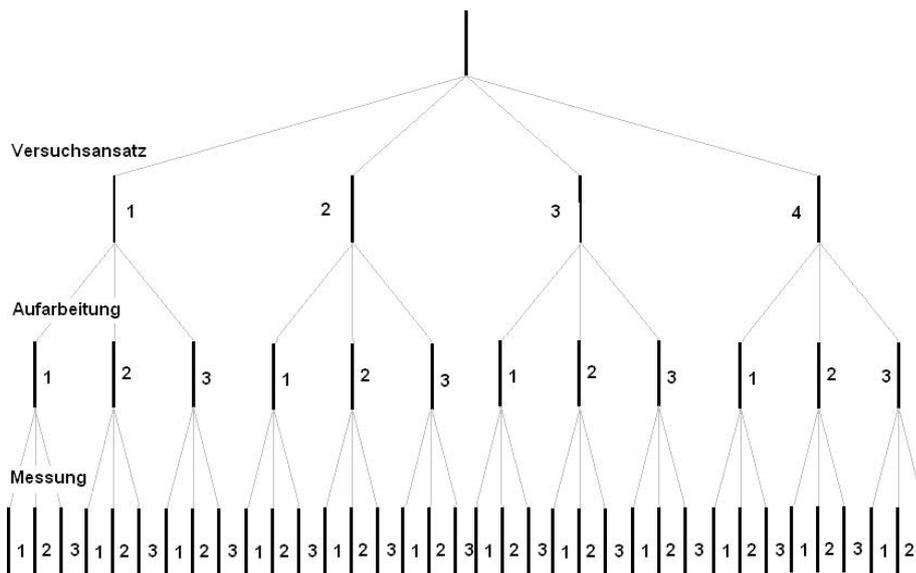
Bei allen untersuchten Pflanzenproben aus den Gefäß- und Feldversuchen sowie zu allen Probenahmeterminen (4-6 Blatt Stadium, Rispschieben und Ernte) war die Bestimmung von Tetracyclinrückständen negativ. Selbst im Falle der Dotierung zu Gülle mit den in der Praxis zu erwartenden Wirkstoffkonzentrationen konnten sowohl für die Kalkulation des durchschnittlichen, als auch für das „worst case“ Szenario mit erhöhter Wirkstoffkonzentration keine Tetracyclinrückstände nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Vorversuchen mit weit überhöhten Konzentrationen, führten die Versuche mit den praxisrelevanten Tetracyclinkonzentrationen zu keinen messbaren Rückstandskonzentrationen.

Um die reale Belastung mit Gülle gedüngten Kulturpflanzen zu bestimmen, wurden zusätzlich Maisproben aus landwirtschaftlichen Gebieten mit intensiver Schweinehaltung auf Tetracyclinrückstände untersucht. Die Proben stammen aus den Regionen „Schwäbisch Hall“ und „Alb-Donau Kreis“ aus Betrieben mit intensiver Schweinehaltung. Die Untersuchungen auf Tetracyclin in diesen landwirtschaftlichen Pflanzenproben ergaben ebenfalls keine Hinweise auf Rückstände.

Die Ergebnisse der Bestimmung von Tetracyclinrückständen in Pflanzenproben sind in Anlage 1 zusammengefasst.

### 6.2.2 Messergebnisse - Bodenproben

Bei den Bodenproben wurden zunächst die Proben aus den Gefäßversuchen untersucht. Nach der ersten Messung zeigte sich eine starke Schwankung der Ergebnisse. Um die Varianz des Versuchsaufbaus im Gewächshaus, der Probenaufarbeitung und -vorbereitung für die Messung sowie der LC-MS Messung abschätzen zu können, wurden alle Bodenproben 3 mal aufgearbeitet und jede dieser Proben 3 mal vermessen. Für den Erntezeitpunkt im Gefäßversuch, bei dem vier „echte“ Parallelen gewonnen wurden, ergab sich für jedes Konzentrationsniveau das in Abbildung 4 dargestellte Untersuchungsprogramm.



**Abbildung 4: Versuchsplan für die Bestimmung der Varianz für Tetracyclin in Bodenproben nach verschachtelter ANOVA**

Die Messungen der praxisrelevanten und der mittleren Konzentration führten zu negativen Befunden, wogegen in den Proben mit erhöhter Tetracyclindotierung  $11,5 \pm 2 \mu\text{g/kg}$  Tetracyclin nachgewiesen wurden. Die Gesamtstreuung von  $2 \mu\text{g/kg}$  kann nach dem Verfahren der zweifachen Varianzanalyse in drei verschiedene Varianzanteile zerlegt werden. Von jedem Versuchsansatz ( $I = 4$ ) wurden gleich viele Teilproben aufgearbeitet (Anzahl je Versuchsansatz:  $J = 3$ ) und alle Messlösungen gleich häufig vermessen (Messungen je Lösung:  $K = 3$ ).

Folgende Varianzkomponenten sollten geschätzt werden:

- Varianz der Abweichungen der unterschiedlichen Versuchsansätze
- Varianz des Aufarbeitungsfehlers
- Varianz des Messfehlers.

Es wurde angenommen, dass die Messergebnisse einem Modell der Form

$$x_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$$x_{ijk} = \mu_i + \beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$$x_{ijk} = \mu_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

genügen, wobei die Fehler  $\alpha_i$ ,  $\beta_{ij}$  und  $\varepsilon_{ijk}$  normalverteilte Zufallsvariablen mit dem Erwartungswert Null sind.  $i = 1, \dots, I$  bezeichnet den Versuchsansatz,  $j = 1, \dots, J$  bezeichnet die Auf-

arbeitung eines Versuchsansatzes und  $k = 1, \dots, K$  ist der Index der Wiederholmessung einer Lösung.

### Berechnungsformeln

Schätzwert für die Varianz des Schätzfehlers:

$$\hat{\sigma}_\varepsilon^2 = \frac{1}{IJ} \sum_i \sum_j \frac{\sum_k (x_{ijk} - \hat{\mu}_{ij})^2}{K-1} \quad \text{mit} \quad \hat{\mu}_{ij} = \frac{1}{K} \sum_k x_{ijk}$$

Schätzwert für die Varianz des Aufarbeitungsfehlers:

$$\hat{\sigma}_\beta^2 = \frac{1}{I} \sum_i \frac{\sum_j (\hat{\mu}_{ij} - \hat{\mu}_i)^2}{J-1} - \frac{\hat{\sigma}_\varepsilon^2}{K} \quad \text{mit} \quad \hat{\mu}_i = \frac{1}{J} \sum_j \hat{\mu}_{ij}$$

Schätzwert für die Varianz des Versuchsansatzfehlers:

$$\hat{\sigma}_\alpha^2 = \frac{\sum_i (\hat{\mu}_i - \hat{\mu})^2}{I-1} - \frac{\hat{\sigma}_\beta^2}{J} - \frac{\hat{\sigma}_\varepsilon^2}{JK} \quad \text{mit} \quad \hat{\mu} = \frac{1}{I} \sum_i \hat{\mu}_i$$

In Tabelle 13 sind die Standardfehlerbeträge und Einzelvarianzen aufgeführt. Somit lässt sich die Gesamtvarianz in drei Einzelvarianzen zerlegen. Es zeigt sich, dass sowohl der Versuchsansatz mit 48% der Gesamtvarianz als auch der Messfehler (39%) den größten Fehleranteil in diesen Untersuchungen haben. Für den Versuchsansatz kann die Varianz auf Unterschiede bei der Ausbringung der Prüfprodukte und auf Inhomogenitäten im Pflanzenaufwuchs und daraus resultierenden Variabilitäten bei der Probenahme zurückzuführen sein. Der hohe Anteil des Messfehlers ist auf die Matrixeinflüsse und auf die massenspektrometrische Detektion an einer Ionenfalle zurückzuführen. In einer Ionenfalle können bei optimierten Messbedingungen immer noch Messfehler von bis zu 50% auftreten. Beide Fehler werden durch Mehrfachbestimmungen berücksichtigt (mindestens 2 Versuchsansätze und mindestens 3-fach Messung positiver Befunde).

**Tabelle 13: Standardfehler und Einzelvarianzen der Variankomponenten (s)**

Fehler	Standardfehlerbeiträge		Einzelvarianzen	
	[µg/kg]	[%]	[µg/kg]	[%]
s(Messung)	2,4	21	5,7	<b>39</b>
s(Aufarbeitung)	0,8	7	0,8	<b>13</b>
s(Versuchsansatz)	2,9	25	2,9	<b>48</b>

Desweiteren wurden die Tetracyclinrückstände in den Böden aus den Gefäß- und Freilandversuchen bestimmt. Dabei wurden für die kinetischen Betrachtungen des Tetracyclinabbaus im Boden der Gefäßversuche zunächst drei Ansätze untersucht. Die drei Probenahmeterminen 4-6 Blatt Stadium, Rispenstadien und Ernte, die auch im Feldversuch beprobt wurden, zeigen einen abnehmenden Trend für die Dotierung mittlerer Konzentration. In Tabelle 14 ist die Abnahme der Tetracyclinkonzentration sowohl im Gefäßversuch mit einer mittleren Dotierung von 53 µg/kg, als auch im Feldversuch für die erhöhte Dotierung mit 116 µg/kg deutlich zu erkennen. Während zum Zeitpunkt des 4-6 Blatt Stadiums 27% bzw. 26% der Tetracyclin-dotierung detektiert werden, führt die Bestimmung des Tetracyclins zum Erntetermin zu einem Befund unterhalb der Nachweisgrenze (4% bzw. 6%).

Die Gefäßversuche wurden ebenfalls mit der praxisrelevanten und erhöhten Konzentration durchgeführt und zum Erntetermin beprobt. Dabei fiel die Rückstandsuntersuchung auf Tetracyclin bei der praxisrelevanten Konzentration negativ aus, wogegen die Dotierung mit der erhöhten Konzentration von 1 mg/L bzw. 187 µg/kg zu Rückständen unter der Nachweisgrenze führten (ca. 11 µg/kg, siehe Tabelle 14).

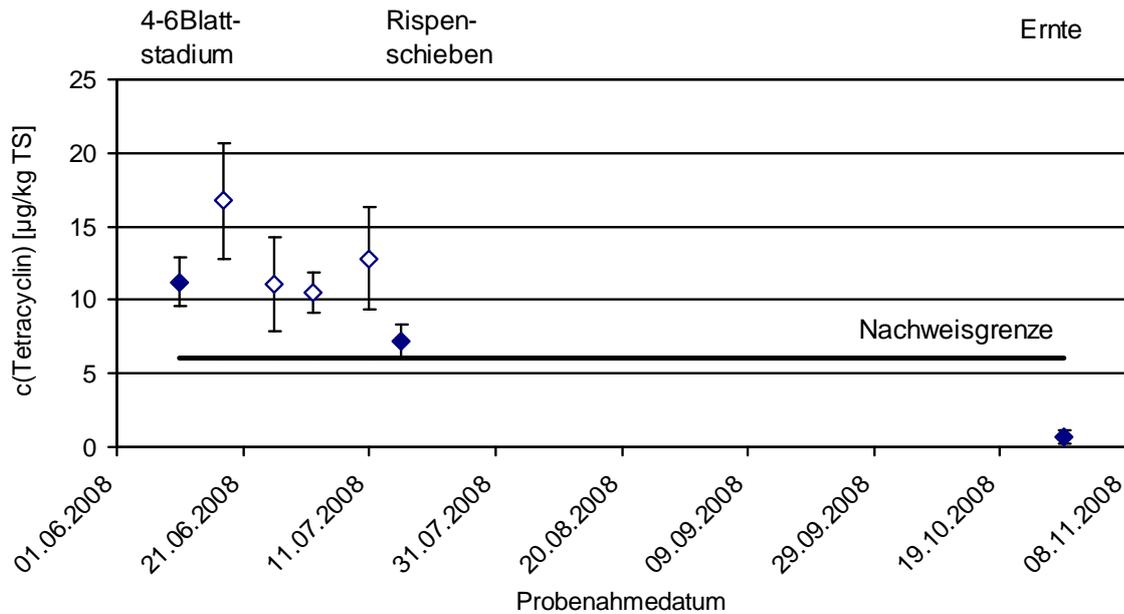
**Tabelle 14: Tetracyclinkonzentrationen (c) und Ausbeute (AB) der im Gefäßversuch und Feldversuch zugesetzten Wirkstoffdotierungen für drei Probenahmezeitpunkte**

			4-6 Blatt 11.06.2008		Rispen-schieben 16.07.2008		Ernte 29.10.2008	
			c [µg/kg]	AB [%]	c [µg/kg]	AB [%]	c [µg/kg]	AB [%]
Dotierung [mg/L] [µg/kg]								
<b>Gefäßversuch</b>								
praxisrelevant	0,05	8	-		-		n.n.	<b>n.n.</b>
mittel	0,5	53	15	<b>27</b>	(7)	<b>13</b>	(2)	<b>4</b>
erhöht	1	187	-		-		(11)	<b>22</b>
<b>Feldversuch</b>								
praxisrelevant	0,3	5	n.n.	<b>n.n.</b>	n.n.	<b>n.n.</b>	n.n.	<b>n.n.</b>
erhöht (0-20 cm)	7	116	30	<b>26</b>	(12)	<b>10</b>	(7)	<b>6</b>
<b>Fraktionierung</b>								
erhöht (0-5 cm)	7	465	-		-		30	<b>26</b>
erhöht (5-20)	7	262	-		-		n.n.	<b>n.n.</b>

n.n. = nicht nachweisbar; (Werte) = unter der Nachweisgrenze; - = keine Probenahme

Im Freilandversuch hatte die Dosierung mit praxisrelevanter Konzentration ebenfalls negative Befunde im Boden zur Folge. Anhand der fraktionierten Probenahme zum Erntetermin kann die Verlagerung von Tetracyclin für die erhöhte Wirkstoffkonzentration bestimmt werden. Dazu wurden zwei Bodenhorizonte beprobt: die Bodenkrume von 0 - 5 cm und eine tiefere Bodenschicht von 5 - 20 cm. Lediglich in der obersten Bodenschicht konnte Tetracyclin detektiert werden (Tabelle 14). Davon ausgehend, dass Tetracyclin nur unwesentlich in tiefere Bodenschichten verlagert werden, würde im Oberboden bis 5 cm eine Tetracyclinausbeute von 26% der ursprünglichen Konzentration verbleiben. Die fehlenden 74% des dotierten Tetracyclins können in den nicht untersuchten Wurzeln und Ernteresten verblieben sein oder durch Komplexbildung oder Adsorption an Bodenbestandteilen der Analytik entgangen sein. Weiterhin ist eine Metabolisierung von Tetracyclin im Boden möglich sowie - entgegen den vorhergehenden Betrachtungen - eine Verlagerung in tiefere Bodenschichten nicht vollständig auszuschließen, da hierbei starke Verdünnungseffekte zu erwarten sind.

Zur Beschreibung der Kinetik von Tetracyclin in Pflanzen und Boden wurden im Gefäßversuch zwischen dem 4-6 Blatt Stadium und dem Rispen-schieben von Mais zusätzlich wöchentlich Pflanzen- und Bodenproben genommen. Die Messungen liefern Rückstandskonzentrationen mit für biologische Versuche üblichen Schwankungen. In Abbildung 5 sind die Ergebnisse des Kinetikversuches in den pflanzlichen Aufwüchsen grafisch dargestellt, wobei der abnehmende Trend der ersten Messungen an den dunklen Messpunkten ersichtlich ist. Um diesen Trend tatsächlich zu bestimmen müssen weitere Probenahmen zwischen dem Termin des Rispen-schiebens und der Ernte erfolgen, da die Schwankungen am Anfang des Versuches eine fundierte Aussage zur Abnahme des Tetracyclins im Boden nicht zulassen.



**Abbildung 5: Kinetik von Tetracyclin in Boden von Gefäßversuchen unter kontrollierten Bedingungen; gefüllte Messpunkte aus der ersten Messung (Tabelle 14)**

Die Ergebnisse der Bestimmung von Tetracyclinrückständen in Bodenproben sind in Anlage 2 zusammengefasst.

### 6.2.3 Leistungsmerkmale

Zur Bestimmung der Leistungsmerkmale der Methode (Nachweisgrenze (NG) und Bestimmungsgrenze (BG)) wurden mit jeder Messserie Matrixkalibrierkurven aufgenommen. Geringe Variationen in der Methodendurchführung liefern dabei Aussagen zur Robustheit der Methode.

Im Falle der Untersuchung von **Pflanzenmaterial** hat die Variation des Analysenmaterials zu unterschiedlichen Probenahmeterminen den größten Einfluss auf die Methodenparameter. Daher wurden Matrixkalibrierkurven mit unterschiedlichem Pflanzenmaterial und zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten aufgenommen. Aus diesen Matrixkalibrierkurven wurden die NG und BG nach DIN 32645 berechnet. Aus Tabelle 15 ist zu erkennen, dass die NG und BG kaum von der verwendeten Pflanzenmatrix beeinflusst werden.

**Tabelle 15: Leistungsmerkmale (Nachweisgrenze (NG) und Bestimmungsgrenze (BG)) für die Bestimmung von Tetracyclin in Pflanzenmaterial (TS = Trockensubstanz, FM = Frischmasse)**

Probenmatrix	Termin	Grenzen nach DIN 32645			Grenzen nach DIN 32645	
		NG [µg/kg TS]	BG [µg/kg TS]	TS [%]	NG [µg/kg FM]	BG [µg/kg FM]
ganze Pflanze	4-6 Blatt Stadium	15	55	10	<b>1</b>	<b>3</b>
ganze Pflanze	Rispen-schieben	17	39	18	<b>3</b>	<b>7</b>
Restpflanze	Ernte	16	41	32	<b>5</b>	<b>13</b>
Körner	Ernte	24	34	80	<b>20</b>	<b>44</b>

Zusätzlich sind die Matrixkalibrierkurven an unterschiedlichen Tagen aufgenommen worden, wobei es zu keiner Beeinträchtigung der analytischen Grenzen kam. Variationen der Einwaage, der Aufreinigung (mit oder ohne Hexanextraktion) und des HPLC-Eluenten (Acetonitril oder Methanol als Eluent B) haben zu keiner Beeinflussung der Methodenparameter geführt. Somit ist die Methode gegenüber kleiner methodischer Variationen robust.

Die unterschiedlichen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im Frischgewicht sind auf verschiedene Trockensubstanzgehalte, wie in Tabelle 15 angegeben, zurückzuführen.

Auch im Falle der **Bodenproben** wurden zur Bestimmung der Leistungsmerkmale der Methode für Tetracyclin verschiedene Matrixkalibrierkurven aufgenommen. Bei der Analyse der Bodenproben zeigte sich, dass unterschiedliche Böden einen starken Einfluss auf die Leistungsfähigkeit der Tetracyclinmethode haben. Während mit dem Boden der Gefäßversuche eine Nachweisgrenze von 6 µg/kg Trockensubstanz erreicht wird, liegt sie bei Boden aus dem Freilandversuch um 25 µg/kg Trockensubstanz (Tabelle 16). Diese Beobachtung ist auf ein stärkeres Grundrauschen in den Chromatogrammen des Freilandbodens im Vergleich zu dem Boden der Gefäßversuche zurückzuführen, was möglicherweise an einer unterschiedlichen Zusammensetzung der Böden liegt.

**Tabelle 16: Leistungsmerkmale (Nachweisgrenze (NG) und Bestimmungsgrenze (BG)) für die Bestimmung von Tetracyclin in Boden (TS = Trockensubstanz)**

Versuch	Termin	Grenzen nach DIN 32645	
		NG [µg/kg TS]	BG [µg/kg TS]
Gefäßversuch	Mischprobe	6	16
Feldversuch	Mischprobe	24	54
Feldversuch	Schicht 0 - 5 cm	26	57
Feldversuch	Schicht 5 - 20 cm	25	81

## 6.3 Enrofloxacin

### 6.3.1 Messergebnisse - Pflanzenproben

Die Bestimmung von Enrofloxacin fiel in allen Pflanzenproben negativ aus. Sowohl die Untersuchung der Proben aus den Freiland- und Gefäßversuchen, als auch der Proben, die zu unterschiedlichen Wachstumsstadien genommen wurden, führten zu einem negativen Befund. Die Dotierung mit praxisrelevanten und mit erhöhten Konzentrationen („worst case“ Szenario) erbrachte keine nachweisbaren Rückstände an Enrofloxacin in der Mais-Grünpflanzen und in den Maiskörnern.

Zur Abschätzung der Belastungssituation bei wirtschaftseigener Düngung von Kulturpflanzen in Praxisbetrieben, wurden Silomaisproben aus landwirtschaftlichen Gebieten mit starker Schweinehaltung auf Enrofloxacinrückstände untersucht. Auch diese Messungen zeigten keine Rückstände im Erntegut.

Die Untersuchungsergebnisse auf Rückstände an Enrofloxacin in Pflanzenproben sind in Anlage 3 zusammengefasst.

### 6.3.2 Messergebnisse - Bodenproben

Die Untersuchungen der Bodenproben auf Enrofloxacin fielen für die Gefäß- und Freilandversuche negativ aus und sind in Anlage 4 zusammengefasst.

### 6.3.3 Leistungsmerkmale

Wie bereits für Tetracyclin dargestellt wurden zur Bestimmung der Leistungsmerkmale der Methode (Nachweisgrenze (NG) und Bestimmungsgrenze (BG)) mit jeder Messserie Matrixkalibrierkurven aufgenommen.

**Tabelle 17: Leistungsmerkmale (Nachweisgrenze (NG) und Bestimmungsgrenze (BG)) für die Enrofloxacinbestimmung in Pflanzenmaterial (TS = Trockensubstanz, FM = Frischmasse)**

Probenmatrix	Termin	Grenzen nach DIN 32645		TS [%]	Grenzen nach DIN 32645	
		NG [ $\mu\text{g}/\text{kg TS}$ ]	BG [ $\mu\text{g}/\text{kg TS}$ ]		NG [ $\mu\text{g}/\text{kg FM}$ ]	BG [ $\mu\text{g}/\text{kg FM}$ ]
ganze Pflanze	4-6 Blatt Stadium	18	42	80	<b>2</b>	<b>4</b>
ganze Pflanze	Rispenschieben	27	64	39	<b>5</b>	<b>11</b>
Restpflanze	Ernte	19	45	18	<b>8</b>	<b>20</b>
Körner	Ernte	20	49	9	<b>17</b>	<b>41</b>

Auch für Enrofloxacin hat die Variation des **Pflanzenmaterials** (unterschiedliche Probenahmezeitpunkte) den größten Einfluss auf die Methodenparameter. Daher wurden Matrixkalibrierkurven mit unterschiedlichen Pflanzenmaterialien und verschiedenen Probenahmezeitpunkten aufgenommen. Hieraus wurden die NG und BG nach DIN 32645 berechnet (Tabelle 17).

Auch für die Bestimmung von Enrofloxacin in Pflanzenmaterial - zu verschiedenen Terminen beprobt - ist nur eine geringe Abweichung der Leistungsmerkmale zu erkennen. Bezieht man die Ergebnisse auf die Frischmasse, werden die NG und BG niedriger. Diese Vorgehensweise bietet sich für die vorliegende Rückstandsanalytik an, da frisches - vegetatives - Pflanzenmaterial durchaus stärker belastet sein kann als generative Pflanzenorgane wie beispielsweise Getreide- oder Maiskörner.

Die Bestimmung der Leistungsmerkmale für die Analyse der **Bodenproben** wurde ebenfalls anhand der Matrixkalibrierkurven durchgeführt und in Tabelle 18 für die verschiedenen Böden aufgelistet. Die Unterschiede der Leistungsgrenzen sind für die Gewächshaus- und Freilandböden nur gering. Im Gegensatz zur Tetracyclinmethode wird demnach die Enrofloxacinmethode weniger von der Bodenzusammensetzung beeinflusst.

**Tab. 18: Leistungsmerkmale (Nachweisgrenze (NG) und Bestimmungsgrenze (BG)) für die Bestimmung von Enrofloxacin im Boden (TS = Trockensubstanz)**

Versuch	Termin	Grenzen nach DIN 32645	
		NG [ $\mu\text{g}/\text{kg TS}$ ]	BG [ $\mu\text{g}/\text{kg TS}$ ]
Gefäßversuch	Mischprobe	8	23
Feldversuch	Mischprobe	4	11
Feldversuch	Schicht 0 - 5 cm	6	16
Feldversuch	Schicht 5 - 20 cm	6	14

## 7 Diskussion

Im Gegensatz zu den Vorversuchen im Jahre 2007 (TÖPPER ET AL. 2008) wurden für die Versuche im laufenden Forschungsprojekt praxisrelevante Wirkstoffkonzentrationen der Antibiotika Tetracyclin und Enrofloxacin für die Düngung mit wirtschaftseigenem Dünger verwendet. Dazu wurden die Konzentrationen anhand von Behandlungsdauer und Wirkstoffdosis für einen durchschnittlichen Schweinemastbetrieb berechnet. Während die praxisrelevante Dotierung lediglich von einer einmaligen Behandlung (z.B. Einstallprophylaxe) ausgeht, wird bei der erhöhten Dotierung zusätzlich mit zwei weiteren therapeutischen Behandlungen gerechnet. Dies könnte einem tatsächlichen „worst case“ Szenario entsprechen. Da die Gülle des

gesamten Mastbetriebes üblicherweise mindestens ein halbes Jahr gesammelt wird, kommt es bei einer Behandlungsdauer von jeweils nur 2 Tagen, in einem halben Jahr im Güllelager zu starken Verdünnungseffekten, die bei der Berechnung ebenfalls berücksichtigt wurden. Dagegen wurde bei den Vorversuchen 2007 von einer permanenten Behandlung eines Tieres ausgegangen und die resultierende Konzentration im Urin als Grundlage für die Dotierung der Versuchspflanzen herangezogen (vgl. GROTE ET AL. 2002). Diese Dotierung war zwar nicht praxisrelevant, führte aber im Modelversuch zu deutlichen Rückständen - auch im Pflanzenmaterial (Tabelle 19).

**Tabelle 19: Rückstände an Chlortetracyclin in Maispflanzen nach 8 Wochen Kultivierung im Modelversuch der Vorversuche von 2007 (FG = Frischgewicht)**

V-Nr.	Konzentration [mg/L]	Pflanzenfraktion	Wiederholung	c(Chlortetracyclin) [µg/kg FG]	
5887	"worst case"	900	ganze Pflanze - vegetativ	1	16
5888	"worst case"	900	ganze Pflanze - vegetativ	2	29
5889	reduziert	100	ganze Pflanze - vegetativ	1	5
5890	reduziert	100	ganze Pflanze - vegetativ	2	4

Die Untersuchungen im 1. Berichtsjahr des Forschungsprojektes zeigen jedoch, dass unter Praxisbedingungen - selbst bei einem sogenannten „worst case“ Szenario - die Bestimmung der Rückstände von Tetracyclin und Enrofloxacin im pflanzlichen Aufwuchs bei Mais zu negativen Befunden führt.

Die Auswertungen der Bodenproben geben für Tetracyclin Hinweise auf eine abnehmende Konzentration mit zunehmender Kulturzeit. Dieser Trend wurde zunächst anhand von Messungen an drei Probenahmeterminen beobachtet, konnte jedoch sowohl im Gefäßversuch bei einer mittleren Dosierung (53 µg/kg Boden) als auch im Feldversuch bei einer höheren Dosierung („worst case“ Szenario 116 µg/kg Boden) bestätigt werden. Somit scheint sich im Laufe des Versuches die Tetracyclinbelastung im Boden über Abbau-, Adsorptions- und Aufnahmeprozesse zu verändern. Für Enrofloxacin fiel die Bestimmung in Bodenproben negativ aus.

## 8 Ausblick

Im Projektjahr 2009 sollen zwei weitere Kulturen (Weizen und Gerste) mit arzneimitteldotierter Gülle behandelt werden und der mögliche Übergang in Pflanzen untersucht werden. Bei den Getreidepflanzen sollen ebenfalls in Feld- und Modelversuchen im Gewächshaus mit der praxisrelevanten und der maximalen Konzentration an Tetracyclin und Enrofloxacin behandelt werden. Beprobung und Behandlung von Pflanzen und Boden finden wie im Vorjahr statt.

Im Modelversuch wird auf eine mittlere Konzentration verzichtet, da diese bereits bei den Maisversuchen zu keinem Ergebnis geführt haben (durchweg negative Befunde). Um die Kinetik der Wirkstoffaufnahme in die Pflanzen untersuchen zu können, wird auf die Dosierungskonzentrationen aus dem Vorversuch im Jahre 2007 zurückgegriffen (kalkulierte Konzentration im Urin eines Tieres während der Behandlung). Demnach wird die Konzentration an Tetracyclin in der Gülle 900 mg/L, die von Enrofloxacin 400 mg/L betragen.

Am CVUA Karlsruhe werden die Analysenmethoden auf die neuen Pflanzenmatrices angepasst und die Validierung der Methoden für alle drei Kulturen durchgeführt. Sobald die Probenahme zu den verschiedenen Zeitpunkten abgeschlossen ist, werden die Pflanzen- und Bodenproben auf Rückstände an Tetracyclin und Enrofloxacin untersucht. Da die Versuche im Projektjahr 2009 mit zwei Kulturen durchgeführt werden, muss mit einem doppelt so hohen Probenaufkommen von ca. 1000 Proben gerechnet werden.

## 9 Literatur

CHRISTIAN T, SCHNEIDER RJ, FÄRBER HA, SKUTLAREK D, MEYER MT, GOLDBACH HE (2003) DETERMINATION OF ANTIBIOTIC RESIDUES IN MANURE, SOIL AND SURFACE WATERS. ACTA HYDROCHIM. HYDROBIOL., **31**:36-44

GROTE M, SCHWAKE-ANDUSCHUS C, STEVENS H, MICHEL R, BETSCHE T, FREITAG M (2006) ANTIBIOTIKA-AUFNAHME VON NUTZPFLANZEN AUS GÜLLE-GEDÜNGTEN BÖDEN – ERGEBNISSE EINES MODELLVERSUCHS. J. VERBRAUCH. LEBENS. **1**, 38-50

SATTELBERGER R, GANS O, MARTINEZ E (2005) VETERINÄRANTIBIOTIKA IN WIRTSCHAFTSDÜNGER UND BODEN. BUNDESUMWELTAMT GMBH WIEN, BERICHT BE-272

TÖPPER A, MOKRY M, HÜTTEROTH A, ZITTLAU E (2008) DRUG RESIDUES IN PLANTS; EURORESIDUE VI CONFERENCE, EGMOND AAN ZEE, THE NETHERLANDS 19.-21.5.08

Ergänzender Abschlussbericht zum Forschungsprojekt

**Transfer von Arzneimittelrückständen in  
Böden und Pflanzen über  
Wirtschaftsdünger tierischer Herkunft**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Gefäß- und Freilandversuche</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Eigenschaften von Tetracyclin und Enrofloxacin</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>7</b>
3.1	Gefäßversuche . . . . .	7
3.1.1	Kinetikversuche mit Körnermais und Sommergerste in wässriger Suspension . . . . .	7
3.1.2	Ertragsstudien mit Sommergerste und Sommerweizen mit Schweinegülle . . . . .	7
3.1.3	Abbaukinetik von Tetracyclin und Enrofloxacin im Boden . . . . .	10
3.2	Feldversuche . . . . .	17
3.2.1	Ertragsstudien mit Wintergerste und Winterweizen mit Gülle . . . . .	17
3.3	Fazit . . . . .	18
<b>A</b>	<b>Mathematischer Anhang</b>	<b>19</b>
A.1	Herleitung der zweiphasigen Abbaukurve . . . . .	19
A.2	Least-Squares-Anpassung der Abbaukurve . . . . .	20
A.3	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten . . . . .	21
A.4	Fehlerrechnung . . . . .	22
<b>B</b>	<b>Experimenteller Anhang</b>	<b>23</b>
B.1	Untersuchung auf Tetracyclin . . . . .	23
B.1.1	Untersuchung von Bodenproben mittels LC-MS . . . . .	23
B.1.2	Untersuchung von Pflanzenproben mittels HPLC-DAD . . . . .	23
B.2	Untersuchung auf Enrofloxacin . . . . .	24
B.2.1	Untersuchung von Bodenproben mittels HPLC-FLD . . . . .	24
B.2.2	Untersuchung von Pflanzenproben mittels LC-MS . . . . .	25
<b>C</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>27</b>

# 1 Gefäß- und Freilandversuche

Im Versuchsjahr 2009 wurden wiederum Feld- sowie Vegetationsversuche in sog. Kick-Brauckmann-Gefäßen im Vegetationshaus des LTZ jeweils mit Getreide (Weizen und Gerste) sowie Körnermais durchgeführt. Die wichtigsten Bodenkenndaten sind in Tabelle 1 aufgeführt. Bei beiden Versuchsböden handelt es sich um leichte Böden mit einem Tongehalt von etwa 20% und ca. 2% Humus. Die gute Durchlüftung der Böden lässt – verbunden mit einer entsprechenden Nährstoffzufuhr – ein gutes Pflanzenwachstum erwarten. Ein mikrobieller Abbau von beispielsweise organischen Schadstoffen ist immer dann gewährleistet, wenn die Wasserversorgung ausreichend und ausgeglichen ist. Dies ist immer bei den Gefäßversuchen, weniger bei den Feldversuchen – ohne Beregnung – gewährleistet.

Tabelle 1: Bodenkenndaten

Kenndaten	Feldversuch	Gefäßversuch
Bodenart	sL	IS
Ackerzahl	32	
pH	5,7	6,2
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> [mg/100 g Boden]	14	16
K <sub>2</sub> O [mg/100 g Boden]	15	2
Mg [mg/100 g Boden]	3	1

Die Prüfsubstanzen Tetracyclin und Enrofloxacin wurden im Falle der „Kinetikversuche zu Körnermais“ (= Gefäßversuche) in Wasser suspendiert jeweils in einer analytischen 900 bzw. 400 mg/L) sowie hohen Konzentration (2000 bzw. 1000 mg/L) eingebracht (Tabellen 2 und 3). Im Block mit Gülle wurden vergleichbar zum Feldversuch mit Getreide die ausgewählten Antibiotika zu der als Wirtschaftsdünger eingesetzten Schweinegülle in 2 verschiedenen Konzentrationen zudotiert und im Rahmen einer praxisüblichen Düngungsmaßnahme ausgebracht.

Im Verlauf der Vegetationsperiode wurden Boden- und Pflanzenproben im Gefäßversuch ab dem 4-6 Blatt Stadium und zur Abschlussernte, im Feldversuch Ende Bestockung, zum Ährenschieben und zur Kornernte entnommen. Hierbei wurden die Frisch- und Trockensubstanzerträge der pflanzlichen Aufwüchse und hieraus die Tetracyclin- sowie Enrofloxacin-Rückstände bestimmt. Ebenso wurden die entnommenen Bodenproben auf Rückstände der verabreichten Antibiotika untersucht (Untersuchungsmethoden siehe Experimenteller Anhang).

Im Feldversuch wurde die behandelte Gülle zur zweiten N-Gabe (Ende März nach erfolgter Andüngung mit mineralischem Stickstoff zu Vegetationsbeginn) gleichmäßig auf der Versuchsfläche verteilt. Nach guter fachlicher Praxis richtet sich die im Feldversuch verabreichte Güllegabe nach dem

Tabelle 2: Gefäßversuche (Datum der Düngung: 08.04.09)

Wirkstoff	Aufzucht von	Gehalt im Dünger/ mg/l	Volumen des Düngers/ ml	Dünger	Termine der Probenahme
Tetracyclin	Gerste	0,3	200	Gülle	10.05., 03.06., 20.07.
		7	200	Gülle	10.05., 03.06., 20.07.
		2000	250	H <sub>2</sub> O, Mineralstoffe	19.05., 03.06., 10.06., 17.06., 26.06., 01.07., 20.07.
	Weizen	0,3	200	Gülle	19.05., 10.06., 11.08.
		7	200	Gülle	19.05., 10.06., 11.08.
	Mais	900	250	H <sub>2</sub> O, Mineralstoffe	10.06., 17.06., 26.06., 01.07., 08.07., 15.07., 04.09.
			250	H <sub>2</sub> O, Mineralstoffe	10.06., 17.06., 26.06., 01.07., 08.07., 15.07., 04.09.
		2000	250	H <sub>2</sub> O, Mineralstoffe	10.06., 17.06., 26.06., 01.07., 08.07., 15.07., 04.09.
	Enrofloxacin	Gerste	0,05	200	Gülle
1			200	Gülle	10.05., 03.06., 20.07.
1000			250	H <sub>2</sub> O, Mineralstoffe	19.05., 03.06., 10.06., 17.06., 26.06., 01.07., 20.07.
Weizen		0,05	200	Gülle	19.05., 10.06., 11.08.
		1	200	Gülle	19.05., 10.06., 11.08.
Mais		400	250	H <sub>2</sub> O, Mineralstoffe	10.06., 17.06., 26.06., 01.07., 08.07., 15.07., 04.09.
			250	H <sub>2</sub> O, Mineralstoffe	10.06., 17.06., 26.06., 01.07., 08.07., 15.07., 04.09.

Stickstoffbedarf der jeweiligen Kulturpflanze in Abhängigkeit von Ertrags-erwartung und Standortbedingungen und kann nach Düngerverordnung (DüV) im Mittel über die landwirtschaftliche, ackerbaulich genutzte Fläche eines Betriebes max. 170 kg N/ha und Jahr betragen. Mit der Schweinegülle wurden zu Winterweizen und Wintergerste jeweils 65 kg N/ha (ca. 40% des errechneten N-Bedarfs) in einer Gabe mit Schleppschlauchtechnik ausgebracht.

Im Gefäßversuch wurden die Antibiotika zum Versuchsansatz in wässriger Suspension bzw. mit der Schweinegülle vermischt in den Boden eingemischt. Der Stickstoffbedarf wurde bei den Kinetikversuchen zu Mais kulturspezifisch in zwei Teilgaben, im Versuch mit Sommergerste und Sommerweizen zusätzlich zur Schweinegülle in ein bzw. zwei weiteren Teilgaben in flüssiger mineralischer Form zugeführt, so dass die Nährstoffversorgung über den gesamten Versuchszeitraum sichergestellt war.

Zu den festgelegten Probenahmeterminen wurden jeweils Pflanzen- und Bodenproben entnommen. Letztere im Feldversuch zu allen Terminen je-

weils in zwei Schichten von 0-5 cm und 6-20 cm; im Gefäßversuch erfolgte eine schichtweise Beprobung nur zur abschließenden Kornernte. Um die Verluste an Antibiotika-Wirkstoffen möglichst gering zu halten und eine mögliche „Verschleierung“ der Wirkstoffe für die nachfolgende, sehr aufwändige Analytik auszuschließen, wurden die Boden- und Pflanzenproben bei 40°C schonend getrocknet, vermahlen und bis zur Analyse in lichtdichten Gefäßen kühl aufbewahrt.

Tabelle 3: Freilandversuche (Datum der Düngung: 14.04.09)

Wirkstoff	Aufzucht von	Gehalt im Dünger/ mg/l	Szenario	Dünger	Termine der Probenahme
Tetracyclin	Gerste	0,3	<i>Realistisch</i>	Gülle	04.05., 01.07.
		7	<i>Worst-Case</i>	Gülle	04.05., 01.07.
	Weizen	0,3	<i>Realistisch</i>	Gülle	04.05., 20.05. (nur Boden), 22.05. (nur Pflanzen), 21.07.
		7	<i>Worst-Case</i>	Gülle	04.05., 20.05. (nur Boden), 22.05. (nur Pflanzen), 21.07.
Enrofloxacin	Gerste	0,05	<i>Realistisch</i>	Gülle	04.05., 01.07.
		1	<i>Worst-Case</i>	Gülle	04.05., 01.07.
	Weizen	0,05	<i>Realistisch</i>	Gülle	04.05., 20.05. (nur Boden), 22.05. (nur Pflanzen), 21.07.
		1	<i>Worst-Case</i>	Gülle	04.05., 20.05. (nur Boden), 22.05. (nur Pflanzen), 21.07.

## 2 Eigenschaften von Tetracyclin und Enrofloxacin

Abbildung 1 zeigt die Strukturformeln der Wirkstoffe Tetracyclin und Enrofloxacin, Tabelle 4 enthält einige aus der jeweiligen Struktur berechnete Eigenschaften<sup>1</sup>. Von beiden Substanzen ist bekannt, dass sie empfindlich auf Licht reagieren. Auf der Bodenoberfläche können sie zwar unter dem Einfluss von UV-Strahlung schnell photolytisch zersetzt werden, die Bindung an Tonminerale oder an organische Bodenbestandteile unterbindet jedoch den photochemischen Abbau. Sowohl Tetracyclin als auch Enrofloxacin sorbieren nachgewiesenermaßen stark an Böden und gelten als persistent [1-5].

<sup>1</sup>Die  $\log D$ -Werte wurden mit Hilfe von ChemAxon's Marvin Calculator Plugins berechnet. Unter dem  $\log D$ -Wert versteht man den Logarithmus des  $pH$ -abhängigen Verteilungskoeffizienten aller Spezies eines Moleküls zwischen einer Oktanol- und einer wässrigen Phase.

Tabelle 4: Berechnete Eigenschaften von Tetracyclin und Enrofloxacin

	Tetracyclin	Enrofloxacin
Molare Masse/ g/mol	444,43456	359,394683
Anzahl der H-Donoren	6	1
Anzahl der H-Akzeptoren	10	7
Anzahl der ionisierbaren Atome	3	2
$\log D @ pH = 3$	-4,91	-1,32
$\log D @ pH = 5$	-2,3	0,6
$\log D @ pH = 7$	-1,53	0,88
$\log D @ pH = 9$	-4,73	-0,95

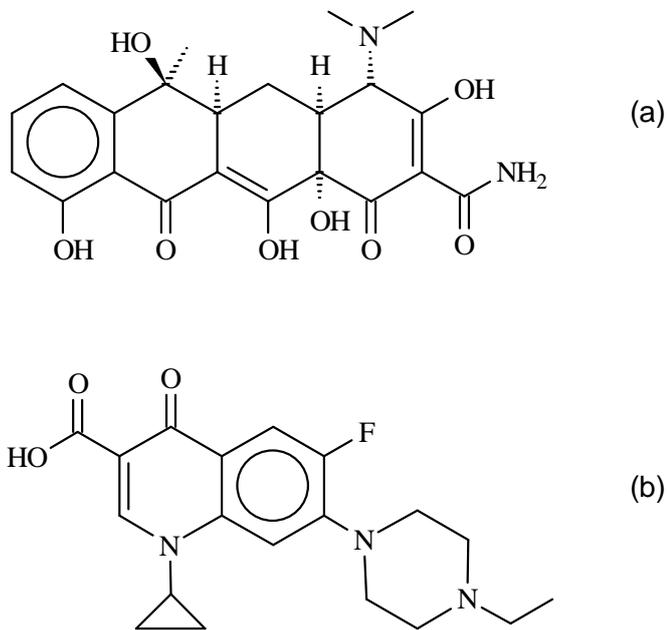


Abbildung 1: Strukturformeln von Tetracyclin (a) und Enrofloxacin (b)

## **3 Ergebnisse und Diskussion**

### **3.1 Gefäßversuche**

Wie bereits in den Maisproben aus dem Versuchsjahr 2008 (die Darstellung der Ergebnisse ist dem Zwischenbericht zu entnehmen) konnte auch in den Getreideproben der Gefäßversuche aus 2009 kein Tetracyclin oder Enrofloxacin nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen damit klar, dass unter praxisrelevanten und -üblichen Bedingungen nicht mit einem Transfer von Antibiotika in Getreide zu rechnen ist. Die Untersuchungsergebnisse der Bodenproben sind in den Tabellen 5 und 6 aufgelistet.

#### **3.1.1 Kinetikversuche mit Körnermais und Sommergerste in wässriger Suspension**

In einem Teilsegment des umfangreich angelegten Gefäßversuches wurden die Antibiotika Tetracyclin bzw. Enrofloxacin in wässriger Suspension hinsichtlich ihres Einflusses auf das Pflanzenwachstum von Körnermais (Kinetik) vergleichend geprüft. Im Vegetationsverlauf gab es bei Körnermais keine Auffälligkeiten. Beginnend mit dem 4-6 Blatt Stadium wurden wöchentlich bis Abschluss „Rispschieben“ Pflanzen- und Bodenproben entnommen. Der Ertragsverlauf (Tabelle 7) zeigt mit Ausnahme der ersten Termine am 10.06. und 17.06. niedrigere Pflanzenerträge bei den Varianten mit hoher Antibiotika-Konzentration. Zum Versuchsende gleichen sich die Unterschiede im Falle der Restpflanze (vegetative Entwicklung stärker betroffen als generative Phase) aus. Die Kornerträge sind nun in den Varianten mit hohen Antibiotika-Gaben mit 5% bis 7% höher. Dieser Unterschied kann zwar statistisch nicht gesichert werden, bestätigt jedoch die Ergebnisse des Vorjahres in der Variante „Antibiotika in wässriger Lösung“. Es kann daher postuliert werden, dass die Zufuhr von Antibiotika-Rückständen im praxisüblichen Rahmen keine Nachteile für das Pflanzenwachstum bringt. Zur Kinetik bei Getreide wurde im Versuchsjahr nur die hohe Konzentration an Antibiotika geprüft (Tabelle 8), da im Zuge eines Vorversuches 2007 die Testung einer praxisüblichen Gabe keine Beeinträchtigung des Pflanzenwachstums ergeben hatte. Die untersuchte Variante „hohe Menge an Antibiotika in Wasser suspendiert“ zeigte ebenso keine Beeinträchtigung der Pflanzenentwicklung wie die niedrige (analytische) Konzentration.

#### **3.1.2 Ertragsstudien mit Sommergerste und Sommerweizen mit Schweinegülle**

Im Hauptversuch (Tabellen 9 und 10) „Antibiotikazugabe mit Schweinegülle“ blieben bei Sommergerste die vegetativen, aber auch die generativen Pflanzenerträge von der hohen – nicht praxisüblichen – Antibiotika-Konzentration

Tabelle 5: Ergebnisse der Untersuchung von Bodenproben aus den Gefäßversuchen ( $m_{\Sigma}(t)/m_{\Sigma}(0)$ : zum Zeitpunkt  $t$  vorhandene Tetracyclinmenge bezogen auf die Tetracyclinmenge zum Zeitpunkt 0)

Tage nach der Düngung, $t/ d$	$m_{\Sigma}(t)/m_{\Sigma}(0)$		
	Mais, 2000 mg/l	Mais, 900 mg/l	Gerste, 2000 mg/l
0	1	1	1
41	–	–	0,00449659
56	–	–	0,00683949
63	0,00404549	0,00280130	0,00291631
70	0,00439079	0,00276285	0,00284313
79	0,00377203	0,00346705	0,00335958
84	0,00423091	0,00447955	0,00295593
91	0,00288561	0,00192518	–
98	0,00364800	0,00242021	–
103	–	–	0,00401891
149	0,00118528	0,00147514	–

Tabelle 6: Ergebnisse der Untersuchung von Bodenproben aus den Gefäßversuchen ( $m_{\Sigma}(t)/m_{\Sigma}(0)$ : zum Zeitpunkt  $t$  vorhandene Enrofloxacinmenge bezogen auf die Enrofloxacinmenge zum Zeitpunkt 0)

Tage nach der Düngung, $t/ d$	$m_{\Sigma}(t)/m_{\Sigma}(0)$		
	Mais, 1000 mg/l	Mais, 400 mg/l	Gerste, 1000 mg/l
0	1	1	1
41	–	–	0,0448699
56	–	–	0,0480325
63	0,0439021	0,0379915	0,0328196
70	0,0375624	0,0489538	0,0285914
79	0,0332019	0,0423093	0,0349061
84	0,0435652	0,0331932	0,0376998
91	0,0190901	0,0242972	–
103	0,0359867	0,0294025	0,0379563
149	0,0237375	0,0207439	–

unbeeinflusst. Dagegen waren die Kornerträge von Sommerweizen in der Extremvariante – vor allem bei Enrofloxacin – tendenziell niedriger.

Tabelle 7: Maiserträge [g TM/Gefäß] im Versuch zur Dynamik der geprüften Antibiotika

Variante		Ertrag – Körnermaisversuch							
Stoff	Aufw. Menge [mg/L]	10.06.	17.06.	26.06.	01.07.	08.07.	15.07.	<i>Kornernte</i>	
		<i>Gesamtpflanze</i>						Körner	Restpflanze
Tetrac.	900	2,6	8,8	40,3	58,9	92,5	119,2	126,8	166,3
Tetrac.	2000	4,1	13,0	35,0	43,5	80,9	100,6	132,5	165,6
Enrofl.	400	2,0	6,6	42,3	59,6	87,3	111,7	123,7	163,6
Enrofl.	1000	3,7	11,4	29,8	53,5	79,3	103,6	132,3	163,7

Tabelle 8: Erträge von Sommergerste [g TM/Gefäß]

Variante		Ertrag – Körnermaisversuch							
Stoff	Aufw. Menge [mg/L]	19.05.	03.06.	10.06.	17.06.	26.06.	01.07.	<i>Kornernte</i>	
		<i>Gesamtpflanze</i>						Körner	Restpflanze
Tetrac.	900								
Tetrac.	2000	27,3	87,3	91,3	112,9	128,2	129,1	72,8	55,0
Enrofl.	400								
Enrofl.	1000	16,2	62,6	67,3	75,4	91,1	105,5	56,7	40,1

Tabelle 9: Erträge von Sommergerste [g TM/Gefäß] – Hauptversuch mit Schweinegülle

Variante		Ertrag – Körnermaisversuch			
Stoff	Aufw. Menge [mg/L]	Ende Bestockung	Ährenschieben	<i>Kornernte</i>	
		<i>Gesamtpflanze</i>		Körner	Restpflanze
Tetrac.	praxisüblich	18,7	70,4	71,8	49,3
Tetrac.	hoch	20,2	69,6	72,7	50,0
Enrofl.	praxisüblich	20,3	65,7	68,2	47,5
Enrofl.	hoch	20,3	63,4	71,1	52,1

Tabelle 10: Erträge von Sommerweizen [g TM/Gefäß] – Hauptversuch mit Schweinegülle

Variante		Ertrag – Körnermaisversuch			
Stoff	Aufw. Menge [mg/L]	Ende Bestockung	Ährenschieben	Kornernte	
		Gesamtpflanze		Körner	Restpflanze
Tetrac.	praxisüblich	16,3	65,5	49,5	69,2
Tetrac.	hoch	16,6	46,9	66,3	50,0
Enrofl.	praxisüblich	17,8	66,3	48,5	68,7
Enrofl.	hoch	17,3	68,5	41,1	66,0

### 3.1.3 Abbaukinetik von Tetracyclin und Enrofloxacin im Boden

Ein weiteres Ziel der zweiten Versuchshälfte war es, Daten zum zeitlichen Verlauf des Tetracyclin- und Enrofloxacinabbaus im Boden zu gewinnen. Die entsprechenden Ergebnisse sind in den Tabellen 5 und 6 wiedergegeben. Die Analyse dieser Abbaudaten führt in beiden Fällen zum selben Typus von Geschwindigkeitsgesetz. Allerdings ist das gesammelte Datenmaterial für die Konstruktion einer Geschwindigkeitsgleichung eigentlich unzureichend, weil Messwerte aus der Anfangsphase unmittelbar nach Versuchsbeginn fehlen. Das nachstehend vorgeschlagene Modell einer zweiphasigen Kinetik bedarf daher noch einer gründlicheren experimentellen Verifizierung, scheint aber eine akzeptable rechnerische Beschreibung des Abbauverhaltens zu liefern.

Wir betrachten zunächst den Abbau von Tetracyclin. Häufig gehorchen Abbauprozesse im Boden in guter Näherung formal einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung. Ein solches Gesetz geht davon aus, dass die Änderung der Menge  $m$  nach der Zeit  $t$  proportional zur Menge  $m$  ist. D.h.,

$$\frac{dm}{dt} = -km \quad (1)$$

Umformung und Integration führt zu

$$\int_{m_0}^{m(t)} \frac{dm}{m} = -k \int_0^t dt$$

$$\Rightarrow m(t) = m_0 e^{-kt} \quad (2)$$

Im vorliegenden Fall jedoch vermag die exponentielle Kurve, die aus der Least-Squares-Anpassung des funktionalen Zusammenhangs der Gleichung (2) resultiert, nicht in zufriedenstellender Weise die experimentellen Befunde zu approximieren. Vielmehr deuten die Messdaten darauf hin, dass dem Abbau von Tetracyclin eine zweiphasige Kinetik zu Grunde liegt: Zunächst lässt sich ein enorm schneller Abfall der Tetracyclinkonzentration beobachten, dann folgt eine flache Plateau-Phase, in der über eine relativ lange Zeit

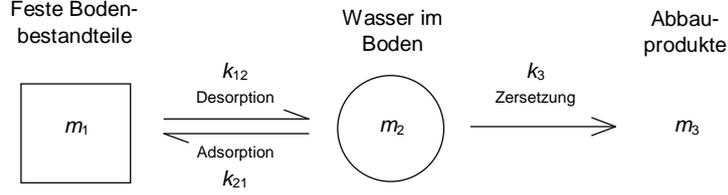


Abbildung 2: Kinetisches Modell der Bodenvorgänge ( $m_1$ : an feste Bestandteile des Bodens adsorbierte Tetracyclinmenge;  $m_2$ : im Bodenwasser gelöste Tetracyclinmenge;  $m_3$ : abgebaute Tetracyclinmenge;  $k_{12}$ : Geschwindigkeitskonstante der Desorption;  $k_{21}$ : Geschwindigkeitskonstante der Adsorption;  $k_3$ : Geschwindigkeitskonstante der Zersetzung)

Tetracyclin nachweisbar ist. Betrachten wir die in Abbildung 2 dargestellten Vorgänge. Wir wollen voraussetzen, dass die Bodenmenge und die Wassermenge konstante Größen sind. Unter der Annahme, dass die zeitlichen Änderungsraten der Mengen  $m_1$  und  $m_2$  lineare Funktionen von  $m_1$  und  $m_2$  sind, erhalten wir das Differentialgleichungssystem

$$\frac{dm_1}{dt} = -k_{12}m_1 + k_{21}m_2 \quad (3)$$

$$\frac{dm_2}{dt} = k_{12}m_1 - (k_3 + k_{21})m_2 \quad (4)$$

Mit den Anfangsbedingungen  $m_1(t=0) = 0$  und  $m_2(t=0) = m_\Sigma(0)$  ergibt sich als spezielle Lösung des Differentialgleichungssystems (Herleitung siehe Mathematischer Anhang A.1)

$$\frac{m_1}{m_\Sigma(0)} = \frac{k_{21}}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{\lambda_1 t} - \frac{k_{21}}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{\lambda_2 t} \quad (5)$$

$$\frac{m_2}{m_\Sigma(0)} = \frac{k_{12} + \lambda_1}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{\lambda_1 t} - \frac{k_{12} + \lambda_2}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{\lambda_2 t} \quad (6)$$

mit

$$\lambda_{1,2} = \frac{-(k_{12} + k_3 + k_{21}) \pm \sqrt{(k_{12} + k_3 + k_{21})^2 - 4k_{12}k_3}}{2} \quad (7)$$

und damit eine zweiphasige Abbaukurve vom Typ

$$\frac{m_\Sigma(t)}{m_\Sigma(0)} = C e^{\lambda_1 t} + (1 - C) e^{\lambda_2 t} \quad (8)$$

wobei  $m_\Sigma(t)$  die Gesamtmenge von Tetracyclin zum Zeitpunkt  $t$  ist, d.h.,  $m_\Sigma(t) = m_1(t) + m_2(t)$ . Für  $C$  gilt:

$$C = \frac{k_{21} + k_{12} + \lambda_1}{\lambda_1 - \lambda_2} \quad (9)$$

Abbildung 3 zeigt die Messwerte aus Tabelle 5 und die an die Daten angepasste Abbaukurve. Wie man erkennen kann, vermag die geschätzte Kurve die Datenpunkte recht gut anzunähern. Sie lautet (d symbolisiert Tage)

$$\frac{m_{\Sigma}(t)}{m_{\Sigma}(0)} = 0,0073e^{-0,0095t/d} + (1 - 0,0073)e^{-0,44t/d} \quad (10)$$

Einsetzen der Parameterschätzwerte in die Gleichungen (33), (35) und (36) (siehe Mathematischer Anhang A.3)<sup>2</sup> liefert als Schätzwerte für die Geschwindigkeitskonstanten<sup>3</sup>

$$\hat{k}_{12} = 0,010 \text{ d}^{-1} \quad \text{KI}_{95\%} = [0,006 \text{ d}^{-1}; 0,011 \text{ d}^{-1}]$$

$$\hat{k}_{21} = 0,003 \text{ d}^{-1} \quad \text{KI}_{95\%} = [0,0008 \text{ d}^{-1}; 0,0038 \text{ d}^{-1}]$$

$$\hat{k}_3 = 0,4 \text{ d}^{-1} \quad \text{KI}_{95\%} = [0,2 \text{ d}^{-1}; 0,5 \text{ d}^{-1}]$$

Damit lassen sich über die Gleichungen (5) und (6) sowie die Beziehung  $m_3(t) = m_{\Sigma}(0) - m_1(t) - m_2(t)$  die in Abbildung 4 dargestellten Kurven berechnen, die die zeitliche Änderung des adsorbierten, des desorbierten bzw. des abgebauten Tetracyclinanteils illustrieren. Die Abbaukurve (10) lässt sich natürlich nicht unmittelbar auf die Freilandbedingungen übertragen, da dort zusätzliche Faktoren und Effekte (z.B. der Transport in vertikaler Richtung) eine Rolle spielen. Dennoch wird die Abnahme der Konzentration in der oberen Bodenschicht auf dem freien Feld vermutlich ebenfalls durch eine biexponentielle Funktion modellierbar sein.

Auch bei Enrofloxacin hat sich eine zweiphasige Abbaukurve vom Typ der Gleichung (8) als geeignete Ausgleichsfunktion erwiesen (siehe Abbildung 5). Die geschätzte Abbaukurve lautet

$$\frac{m_{\Sigma}(t)}{m_{\Sigma}(0)} = 0,0610e^{-0,0067t/d} + (1 - 0,0610)e^{-0,38t/d} \quad (11)$$

Die Schätzwerte für die Geschwindigkeitskonstanten sind:

$$\hat{k}_{12} = 0,007 \text{ d}^{-1} \quad \text{KI}_{95\%} = [0,004 \text{ d}^{-1}; 0,009 \text{ d}^{-1}]$$

$$\hat{k}_{21} = 0,022 \text{ d}^{-1} \quad \text{KI}_{95\%} = [0,007 \text{ d}^{-1}; 0,026 \text{ d}^{-1}]$$

$$\hat{k}_3 = 0,35 \text{ d}^{-1} \quad \text{KI}_{95\%} = [0,12 \text{ d}^{-1}; 0,42 \text{ d}^{-1}]$$

Gegenüber Tetracyclin wird Enrofloxacin erheblich schneller adsorbiert aber nur geringfügig langsamer desorbiert. Infolgedessen ist der Anteil an freiem – und damit zersetzbarem – Tetracyclin stets größer als der Anteil an

<sup>2</sup>Die Vorgehensweise, erst den Zusammenhang der Gleichung (8) an die Daten anpassen und dann aus den Parameterschätzwerten die Geschwindigkeitskonstanten zu ermitteln, hat rechentechnische Gründe.

<sup>3</sup>Bestimmung der Konfidenzintervalle  $\text{KI}_{95\%}$  siehe Mathematischer Anhang A.4.

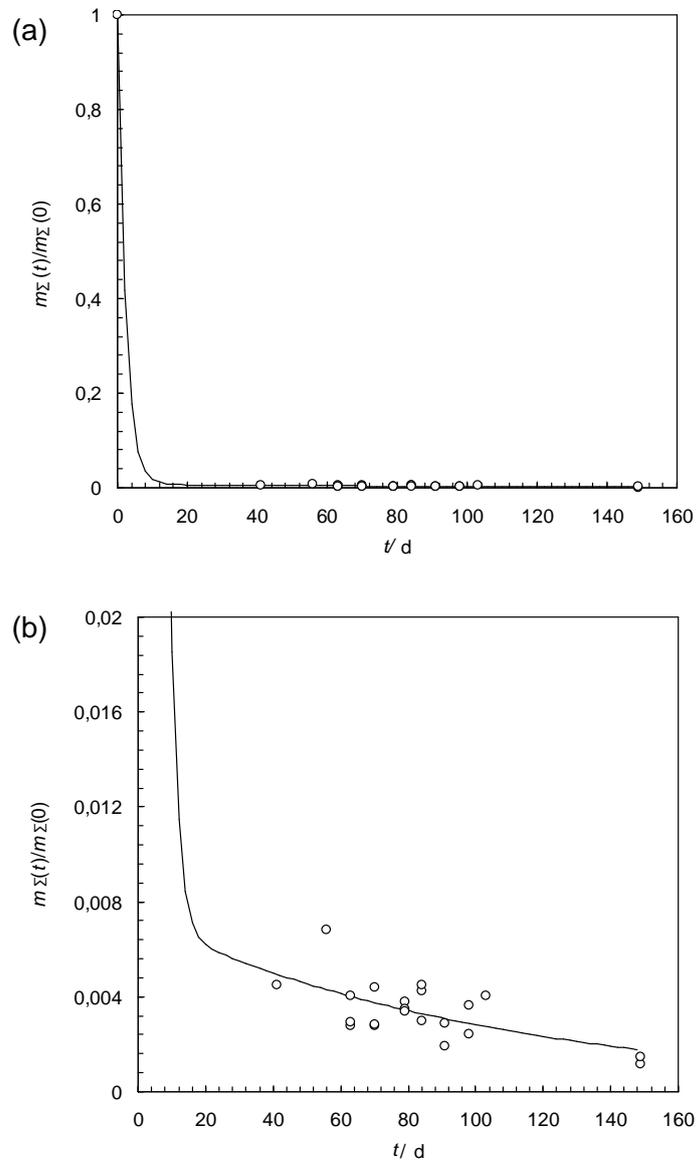


Abbildung 3: Abbau von Tetracyclin im Gefäßversuch ((a): maximale Ordinatenskalierung; (b) gezoomter Ausschnitt)

freiem Enrofloxacin. Obwohl sich die beiden Zersetzungsgeschwindigkeiten nicht signifikant voneinander unterscheiden, erweist sich daher Enrofloxacin als persistenter. In Abbildung 6 sind die beiden Abbaukurven noch einmal im Vergleich dargestellt. Diese Ergebnisse beziehen sich natürlich nur auf die betrachteten Gefäßsysteme.

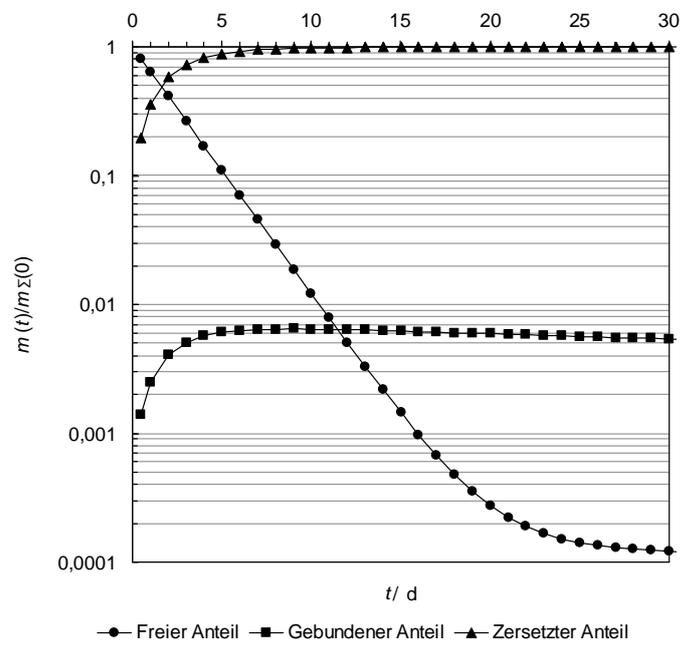


Abbildung 4: Gebundener, freier und zersetzter Tetracyclinanteil in Abhängigkeit von der Zeit (logarithmische Ordinatenskalierung)

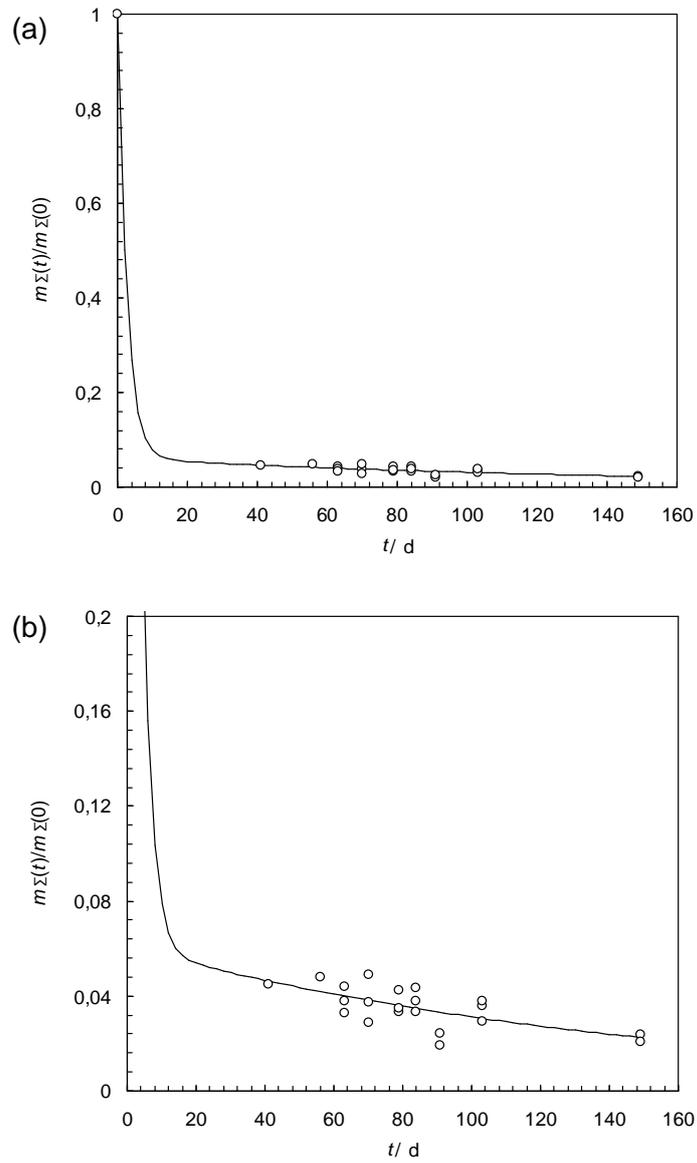


Abbildung 5: Abbau von Enrofloxacin im Gefäßversuch ((a): maximale Ordinatenkalierung; (b) gezoomter Ausschnitt)

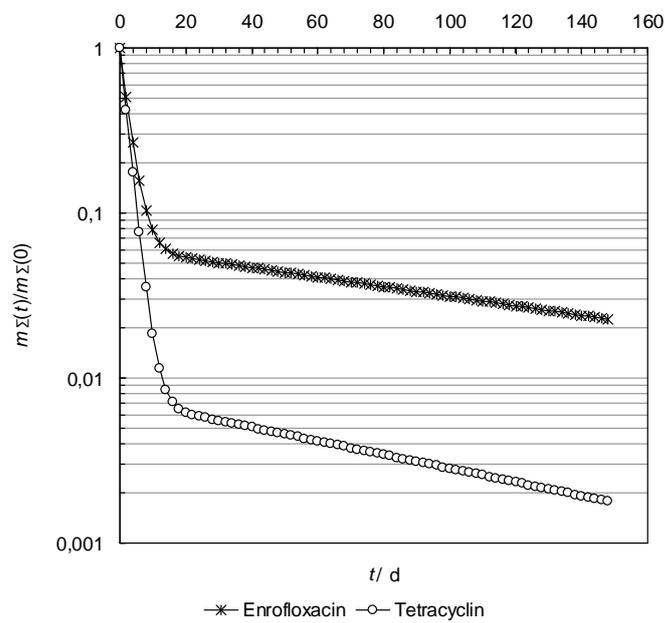


Abbildung 6: Vergleich der Abbaukurven von Tetracyclin und Enrofloxacin (logarithmische Ordinatenkalierung)

## 3.2 Feldversuche

Die ersten Boden- und Pflanzenproben wurden 20 Tage nach Ausbringung der jeweils mit Tetracyclin oder Enrofloxacin belasteten Gülle entnommen. Sowohl bei der mit Tetracyclin als auch bei der mit Enrofloxacin belasteten Düngevariante konnte bei keiner der umfangreich gewonnenen Pflanzen- und Getreideproben ein Übergang der Antibiotika in das Getreide beobachtet werden. Dies gilt sowohl für die Versuche mit realistischen als auch mit Worst-Case-Konzentrationen. Wie die Gefäßversuche zeigen auch die Freilandversuche eindeutig, dass unter Praxisbedingungen nicht mit einem Eintrag von Tetracyclin oder Enrofloxacin in das Lebens- oder Futtermittel Getreide zu rechnen ist.

### 3.2.1 Ertragsstudien mit Wintergerste und Winterweizen mit Gülle

Nach Ausbringung der ersten N-Gabe in Form von Mineraldünger wurden mit der Güllegabe in der letzten Märzdekade 65 kg N/ha sowie die im Versuchsplan festgelegten Antibiotikamengen ausgebracht. Die Pflege des Versuches sowie eine dritte N-Gabe zu Winterweizen wurden routinemäßig vom Versuchsbetrieb des LTZ Augustenberg durchgeführt. Ebenso wurden die Boden- und Pflanzenproben nach Versuchsplan entnommen und weiter verarbeitet. In der Tabelle 11 sind die Kornerträge von Winterweizen und Wintergerste nach Teildüngung mit Schweinegülle mit Antibiotikazusatz im Vergleich zu einer Kontrollvariante „S.Gülle ohne Zugabe von Antibiotika“ dargestellt. Wie im Versuchsjahr 2008 mit Körnermais sind auch beim Getreide die Erträge nach Antibiotika-Zugabe tendenziell etwas niedriger. Es fällt auf, dass die unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Antibiotika einen kleinen – nicht signifikanten – Ertragseinfluss von etwa 2% Mehr- bzw. 2% Minderertrag haben. Wie im Vorjahr waren während der Vegetationsperiode keine wachstumshemmenden Effekte durch die Antibiotika feststellbar.

Tabelle 11: Kornerträge von Winterweizen und Wintergerste im Feldversuch 2009

Variante		Ertrag – Körnermaisversuch	
Stoff	Aufw. Menge	Winterweizen	Wintergerste
<b>Kontrolle</b> (S.Gülle ohne Zusatz)		4,20	6,03
<b>S.Gülle mit:</b>			
Tetrac.	praxisüblich	4,19	5,71
Tetrac.	hoch	4,11	5,77
Enrofl.	praxisüblich	4,22	5,87
Enrofl.	hoch	4,13	5,98

### 3.3 Fazit

Die Ergebnisse der dargestellten Untersuchungen zeigen klar auf, dass weder in Gefäßversuchen unter stark standardisierten Bedingungen, noch bei Freilandversuchen ein Eintrag der Antibiotika Tetracyclin oder Enrofloxacin in Getreide und Körnermais über wirtschaftseigene Dünger zu erwarten ist. Ebenso weisen in den Gefäß- wie Feldversuchen über zwei Vegetationsperioden Körnermais sowie Getreide weder in den Versuchsreihen „Antibiotika in wässriger Suspension“, noch in der Reihe „Antibiotika in Schweinegülle eingemischt“ signifikante Wachstumsunterschiede auf. Geringe Abweichungen – insbesondere beim Kornertag im Feldversuch – sind schlüssiger auf Inhomogenitäten der Versuchsböden zurückzuführen. Dies kann besonders bei der Wasserversorgung – auch im Gefäßversuch – zu Beeinflussungen des Pflanzenwachstums führen. Die Unterschiede sind jedoch nicht auf negative Einflüsse der Antibiotika-Zufuhr zurückzuführen, da häufig die hohen – in der Praxis absolut unrealistischen Konzentrationen – sogar ein besseres Wachstum andeuten (C-Quelle für Bodenmikroorganismen?). Die analysierten Boden- und Pflanzenproben wiesen sowohl bei den realistischen Konzentrationen als auch bei der Behandlung unter Worst-Case-Bedingungen keinen auffälligen Befund auf. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu Untersuchungen der Arbeitsgruppe Grote et al. [6], die zum Teil einen erheblichen Eintrag von Antibiotika über wirtschaftseigene Dünger in Pflanzen nachgewiesen haben. In den Versuchen von Grote et al. [6] wurde der Transfer jedoch unter Bedingungen (Kulturen und Düngermenge) untersucht, die in der landwirtschaftlichen Praxis nicht zu erwarten sind. Darauf wurde bereits im Zwischenbericht ausführlich eingegangen. Weitergehende Untersuchungen von der gleichen Arbeitsgruppe (Freitag et al. [7]), die den Antibiotika-Transfer aus dem Boden in Getreide auf Praxisbetrieben geprüft haben, kommen zum Ergebnis, dass nicht mit einer flächendeckenden Belastung des Getreides durch Antibiotika aus Gülle zu rechnen ist. In den untersuchten Proben konnten aber wenige positive Befunde bestätigt werden. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen jedoch ein anderes Bild. Es wurden viele Proben zu unterschiedlichen Erntezeitpunkten entnommen. Jedoch waren in keiner der untersuchten Getreideproben Rückstände von Antibiotika nachweisbar. Das die in der Gülle dotierten Antibiotikamengen das Bild der Praxis wieder spiegeln, konnte anhand der bereits im Zwischenbericht dargestellten Rückstandsanalysen in Güllen von Praxisbetrieben klar gezeigt werden. Auch die Untersuchungen von Freitag et al. [7] konnten unter Praxisbedingungen keinen direkten Zusammenhang zwischen den vereinzelt gefundenen Antibiotikarückständen und den behandelten Viehbeständen finden.

## A Mathematischer Anhang

### A.1 Herleitung der zweiphasigen Abbaukurve

Die Gleichungen

$$\frac{dm_1}{dt} = -k_{12}m_1 + k_{21}m_2 \quad (12)$$

$$\frac{dm_2}{dt} = k_{12}m_1 - (k_3 + k_{21})m_2 \quad (13)$$

bilden ein homogenes lineares Differentialgleichungssystem zweiter Ordnung. Die Matrizendarstellung dieses Systems lautet:

$$\begin{pmatrix} \dot{m}_1 \\ \dot{m}_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{12} & k_{21} \\ k_{12} & -(k_3 + k_{21}) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} m_1 \\ m_2 \end{pmatrix} \quad (14)$$

Zur Lösung diese DGL-Systems bestimmen wir zunächst die Eigenwerte  $\lambda$  der Koeffizientenmatrix:

$$\left| \begin{pmatrix} -k_{12} & k_{21} \\ k_{12} & -(k_3 + k_{21}) \end{pmatrix} - \begin{pmatrix} \lambda & 0 \\ 0 & \lambda \end{pmatrix} \right| = 0 \quad (15)$$

$$\left| \begin{pmatrix} -k_{12} - \lambda & k_{21} \\ k_{12} & -(k_3 + k_{21}) - \lambda \end{pmatrix} \right| = 0$$

$$(-k_{12} - \lambda)[-(k_3 + k_{21}) - \lambda] - k_{12}k_{21} = 0$$

$$\lambda^2 + (k_{12} + k_3 + k_{21})\lambda + k_{12}k_3 = 0$$

$$\Rightarrow \lambda_{1,2} = \frac{-(k_{12} + k_3 + k_{21}) \pm \sqrt{(k_{12} + k_3 + k_{21})^2 - 4k_{12}k_3}}{2} \quad (16)$$

Die erste Lösungsfunktion  $m_1$  erhalten wir durch Linearkombination der Exponentialfunktionen  $e^{\lambda_1 t}$  und  $e^{\lambda_2 t}$ :

$$m_1 = Ae^{\lambda_1 t} + Be^{\lambda_2 t} \quad (17)$$

Die zweite Lösungsfunktion  $m_2$  gewinnen wir, indem wir die erste Lösungsfunktion  $m_1$  zusammen mit ihrer Ableitung  $\dot{m}_1$  in die Gleichung (12) einsetzen und anschließend (12) nach  $m_2$  auflösen:

$$\begin{aligned} m_2 &= \frac{k_{12}}{k_{21}} (Ae^{\lambda_1 t} + Be^{\lambda_2 t}) + \frac{1}{k_{21}} (\lambda_1 Ae^{\lambda_1 t} + \lambda_2 Be^{\lambda_2 t}) \\ m_2 &= \frac{k_{12} + \lambda_1}{k_{21}} Ae^{\lambda_1 t} + \frac{k_{12} + \lambda_2}{k_{21}} Be^{\lambda_2 t} \end{aligned} \quad (18)$$

Die Gleichungen (17) und (18) bilden die allgemeine Lösung des DGL-Systems. Mit den Anfangsbedingungen  $m_2(t=0) = m_\Sigma$  und  $m_1(t=0) = 0$  wird daraus

$$0 = A + B \quad (19)$$

$$m_\Sigma(0) = \frac{k_{12} + \lambda_1}{k_{21}}A + \frac{k_{12} + \lambda_2}{k_{21}}B \quad (20)$$

Es folgt für  $A$  und  $B$ :

$$A = m_\Sigma(0) \frac{k_{21}}{\lambda_1 - \lambda_2} \quad (21)$$

$$B = -m_\Sigma(0) \frac{k_{21}}{\lambda_1 - \lambda_2} \quad (22)$$

Damit erhalten wir für die partikuläre Lösung des DGL-Systems

$$\frac{m_1}{m_\Sigma(0)} = \frac{k_{21}}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{\lambda_1 t} - \frac{k_{21}}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{\lambda_2 t} \quad (23)$$

$$\frac{m_2}{m_\Sigma(0)} = \frac{k_{12} + \lambda_1}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{\lambda_1 t} - \frac{k_{12} + \lambda_2}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{\lambda_2 t} \quad (24)$$

Für die Gesamtmenge des zum Zeitpunkt  $t$  noch vorhandenen Wirkstoffes,  $m_\Sigma(t)$ , bezogen auf die gesamte Anfangsmenge  $m_\Sigma(0)$  gilt

$$\frac{m_\Sigma(t)}{m_\Sigma(0)} = \frac{k_{21} + k_{12} + \lambda_1}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{\lambda_1 t} - \frac{k_{21} + k_{12} + \lambda_2}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{\lambda_2 t} \quad (25)$$

bzw.

$$\frac{m_\Sigma(t)}{m_\Sigma(0)} = C e^{\lambda_1 t} + (1 - C) e^{\lambda_2 t} \quad (26)$$

mit

$$C = \frac{k_{21} + k_{12} + \lambda_1}{\lambda_1 - \lambda_2} \quad (27)$$

## A.2 Least-Squares-Anpassung der Abbaukurve

Zur Konstruktion einer zweiphasigen Abbaukurve wurde an die Datenpunkte

$$\left( t_i, \frac{m_\Sigma(t_i)}{m_\Sigma(0)} \right)_{i=1, \dots, n}$$

ein Modell vom Typ

$$\frac{m_\Sigma(t_i)}{m_\Sigma(0)} = C e^{\lambda_1 t_i} + (1 - C) e^{\lambda_2 t_i} + \epsilon_i \quad \epsilon_i \sim N(0; \sigma^2) \quad (28)$$

durch Minimierung der Fehlerquadratsumme angepasst. Die Berechnungen wurden mit Excel unter Zuhilfenahme des Solver-Add-Ins durchgeführt. Die

vom Solver benötigten Startwerte wurden im vorliegenden Fall wie folgt ermittelt: Zunächst wurde durch die Datenpaare

$$\left( t_{2,\dots,n}, \ln \left( \frac{m_{\Sigma}(t_{2,\dots,n})}{m_{\Sigma}(0)} \right) \right)$$

eine Ausgleichsgerade mit Ordinatenabschnitt  $\beta_1$  und Steigung  $\beta_2$  gezogen. Anschließend wurde  $C_{Start}$  gleich  $e^{\beta_1}$  und  $\lambda_{1,Start}$  gleich  $\beta_2$  gesetzt.  $\lambda_{2,Start}$  wurde nach

$$\lambda_{2,Start} = \frac{\ln \left( \frac{m_{\Sigma}(t_2)}{m_{\Sigma}(0)} \right)}{t_2}$$

berechnet.

### A.3 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten

$\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  und  $C$  seien gegeben, gesucht sind die Konstanten  $k_{12}$ ,  $k_{21}$  und  $k_3$ . Aus

$$\lambda_{1,2} = \frac{-(k_{12} + k_3 + k_{21}) \pm \sqrt{(k_{12} + k_3 + k_{21})^2 - 4k_{12}k_3}}{2} \quad (29)$$

folgt das System

$$\lambda_1^2 + \lambda_1 (k_{12} + k_3 + k_{21}) + k_{12}k_3 = 0 \quad (30)$$

$$\lambda_2^2 + \lambda_2 (k_{12} + k_3 + k_{21}) + k_{12}k_3 = 0 \quad (31)$$

(30) minus (31) ergibt

$$\lambda_1^2 - \lambda_2^2 + (\lambda_1 - \lambda_2) (k_{12} + k_3 + k_{21}) = 0 \quad (32)$$

Umformung führt zu

$$k_3 = -\lambda_2 - \lambda_1 - k_{12} - k_{21} \quad (33)$$

Wir setzen (33) in (30) ein und erhalten

$$-\lambda_1\lambda_2 - k_{12}(\lambda_2 + \lambda_1) - k_{12}^2 - k_{12}k_{21} = 0 \quad (34)$$

Wir lösen (27) nach  $k_{21}$  auf und schreiben

$$k_{21} = C(\lambda_1 - \lambda_2) - \lambda_1 - k_{12} \quad (35)$$

Einsetzen von (35) in (34) und Auflösen nach  $k_{12}$  liefert

$$k_{12} = \frac{-\lambda_1\lambda_2}{\lambda_2 + C(\lambda_1 - \lambda_2)} \quad (36)$$

## A.4 Fehlerrechnung

Die  $(1 - \alpha)$ -Konfidenzintervalle um die Schätzwerte der Geschwindigkeitskonstanten wurden mittels Bootstrapping konstruiert (Resampling mit Ersetzung). Die Grundidee des Bootstrappings ist einfach. Nehmen wir an, wir haben eine Stichprobe und schätzen aus dieser einen Populationsparameter. Wenn die Stichprobe eine gute Näherung der Grundgesamtheit darstellt, kann man die Stichprobenverteilung der Schätzgröße dadurch simulieren, dass man aus der ursprünglichen Stichprobe viele weitere Stichproben desselben Umfangs „mit Zurücklegen“ zieht und Replikationen der Schätzgröße berechnet. In einer Bootstrap-Stichprobe können Werte aus der ursprünglichen Stichprobe einmal, mehrfach oder gar nicht vorkommen. Je nach Struktur des Modells, ist eine spezifische Art und Weise der Anwendung erforderlich. Im vorliegenden Fall wurde die Technik „Bootstrapping der Residuen“ eingesetzt [8]. Der angewandte Algorithmus lautet (der Einfachheit halber wird  $\frac{m_\Sigma(t)}{m_\Sigma(0)}$  durch  $y$  ersetzt):

1. Berechne die Residuen  $\hat{\epsilon}_{2,\dots,n}$  nach

$$\hat{\epsilon}_{2,\dots,n} = y_{2,\dots,n} - \hat{y}_{2,\dots,n}$$

2. Ziehe  $(n - 1)$  mal zufällig mit Zurücklegen aus  $(\hat{\epsilon}_2, \dots, \hat{\epsilon}_n)$  und erhalte so die Bootstrap-Stichprobe  $(\hat{\epsilon}_2^{*1}, \dots, \hat{\epsilon}_n^{*1})$ .
3. Erzeuge die Bootstrap-Responses  $y_{2,\dots,n}^{*1}$  über

$$y_{2,\dots,n}^{*1} = \hat{y}_{2,\dots,n} + \hat{\epsilon}_{2,\dots,n}^{*1}$$

4. Ermittle aus den Punkten  $(t_{2,\dots,n}, y_{2,\dots,n}^{*1})$  durch Minimierung der Abweichungsquadrate  $\hat{C}^{*1}$ ,  $\hat{\lambda}_1^{*1}$  und  $\hat{\lambda}_2^{*1}$ . Berechne daraus  $\hat{k}_{12}^{*1}$ ,  $\hat{k}_{21}^{*1}$  und  $\hat{k}_3^{*1}$ .
5. Wiederhole die Schritte 2 bis 4 mehrere male, sagen wir  $B$ . Sortiere für jede Geschwindigkeitskonstante die Schätzwerte  $\hat{k}^{*1}, \dots, \hat{k}^{*B}$  der Größe nach. Nimm das  $100 \cdot \frac{\alpha}{2}$ -Perzentil als untere und das  $100 \cdot (1 - \frac{\alpha}{2})$  als obere Grenze des  $(1 - \alpha)$ -Konfidenzintervalls.

## B Experimenteller Anhang

### B.1 Untersuchung auf Tetracyclin

#### B.1.1 Untersuchung von Bodenproben mittels LC-MS

##### *Aufarbeitung*

1 g Probe (Trockensubstanz) werden in ein 15 ml PP-Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 1,25 ml McIlvain-Puffer  $pH$  4,0 versetzt. Nach Zugabe von 6 ml Ethylacetat wird der Ansatz 15 min geschüttelt und anschließend 10 min mit 4000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird entnommen und die untere Phase ein zweites mal mit Ethylacetat extrahiert. Die Ethylacetatextrakte werden in einem 12 ml Glas-Zentrifugenröhrchen vereinigt und bei 40 °C unter  $N_2$ -Strom zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in 0,5 ml 0,1 M  $(H_3PO_4)_{aq}$  aufgenommen. Die Lösung wird durch einen Membranfilter in ein Glasvial mit Mikroinsatz filtriert und zur LC-MS-Analyse eingesetzt.

##### *Chromatographie*

Säule: Phenomenex Luna C 18 (2), 5  $\mu m$ , 150 mm  $\times$  2 mm. Flussrate: 0,3 ml/min. Säulenofen: 40 °C. Injektionsvolumen: 40  $\mu l$ . Eluent A: 0,1%  $(CH_3COOH)_{aq}$ -Lösung; Eluent B: MeOH. Gradient:  $t = 0$  min, 95% A : 5% B  $\rightarrow t = 5$  min, 90% A : 10% B  $\rightarrow t = 18$  min, 55% A : 45% B  $\rightarrow t = 19$  min, 10% A : 90% B  $\rightarrow t = 21$  min, 10% A : 90% B  $\rightarrow t = 23$  min, 95% A : 5% B  $\rightarrow t = 35$  min, 95% A : 5% B.

##### *MS/MS-Datenakquisition*

ESI-(+),  $MS^2$ ,  $m/z$  445  $\rightarrow m/z$  410 &  $m/z$  427.

##### *Quantifizierung und Leistungsdaten*

Zur Quantifizierung wurde eine Matrix-angepasste Kalibration durchgeführt. Bei dieser Vorgehensweise werden die Messlösungen zur Kalibrierung des Messgerätes dadurch hergestellt, dass man Leerproben auf unterschiedliche Niveaus dotiert und anschließend diese Proben der vollständigen Aufarbeitungsprozedur unterwirft. Leistungsmerkmale des Verfahrens (bezogen auf die Analyse von Trockensubstanz):  $NG = 10 \mu g/kg$ ,  $BG = 30 \mu g/kg$ .

#### B.1.2 Untersuchung von Pflanzenproben mittels HPLC-DAD

##### *Extraktion*

5 g Probe (Trockensubstanz) werden in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 50 ml Puffer-Lösung  $pH$  4 (Bernsteinsäureanhydrid/ $H_2O$ /NaOH) versetzt. Der Ansatz wird 15 min geschüttelt, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 15 min bei 4 °C mit 4000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird durch einen Faltenfilter in einen Messzylinder überführt.

### *Säulenaufreinigung I*

Säulenmaterial: chelatisierende Sepharose.

Vorbereitung (Beladung mit  $\text{Cu}^{2+}$ ):

→ 20 ml  $(\text{CuSO}_4)_{aq}$

→ 15 ml Puffer-Lösung (Bernsteinsäureanhydrid/ $\text{H}_2\text{O}$ / $\text{NaOH}$ ).

Die Probe wird auf die Säule gegeben. Anschließend wird mit 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 30 ml MeOH sowie  $2 \times 10$  ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und mit 50 ml EDTA-Puffer (Puffer-Lösung  $pH$  4/EDTA- $\text{Na}_2$ ) eluiert.

### *Säulenaufreinigung II*

Extraktionssäule: RP 18, 500 mg, 3 ml.

Waschen/Konditionieren:

→ 3 ml MeOH

→ 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$ .

Die Probe wird auf die Säule gegeben. Anschließend wird mit 2 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen, kurz trocken gesaugt und mit 6 ml methanolischer Oxalsäure eluiert. Das Eluat wird mit 1 ml Ethylenglykol/3-Mercaptopropionsäure $_{MeOH}$  versetzt, eingengt und der Rückstand wird in 450  $\mu\text{l}$  0,1 M  $(\text{H}_3\text{PO}_4)_{aq}$  aufgenommen. Die Lösung wird durch einen Membranfilter in ein Glasvial mit Mikroinsatz filtriert und zur HPLC-Analyse eingesetzt.

### *Chromatographie*

Säule: Phenomenex Luna C 18 (2), 5  $\mu\text{m}$ , 150 mm  $\times$  2 mm. Flussrate: 0,3 ml/min. Säulenofen: 40 °C. Injektionsvolumen: 20  $\mu\text{l}$ . Eluent A: 0,01 M Oxalsäure $_{aq}$ -Lösung; Eluent B: Acetonitril. Gradient:  $t = 0$  min, 90% A : 10% B →  $t = 5,5$  min, 90% A : 10% B →  $t = 23$  min, 55% A : 45% B →  $t = 25$  min, 90% A : 10% B →  $t = 35$  min, 90% A : 10% B.

### *Detektion*

Dioden-Array, Range: 300-460 nm.

### *Quantifizierung und Leistungsdaten*

Die Quantifizierung erfolgte über eine Matrix-angepasste Kalibrierkurve. Leistungsmerkmale des Verfahrens (bezogen auf die Analyse von Trockensubstanz):  $NG = 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $BG = 30 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

## **B.2 Untersuchung auf Enrofloxacin**

### **B.2.1 Untersuchung von Bodenproben mittels HPLC-FLD**

#### *Aufarbeitung*

1 g Probe (Trockensubstanz) werden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen ein-

gewogen. Nach Zugabe von 5 ml Extraktionslösung (Aceton/H<sub>2</sub>O/(NH<sub>4</sub>)<sub>aq</sub>, 50 : 25 : 25) wird der Ansatz 5 min in ein Ultraschallbad gestellt, dann 10 min geschüttelt und anschließend 10 min mit 4000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird entnommen und der Bodensatz mit weiteren 5 ml Extraktionslösung extrahiert. Die Überstände werden vereinigt und der organische Lösungsmittel-Anteil bei 40 °C mit N<sub>2</sub> abgeblasen. Der Ansatz wird mit 5 ml (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>aq</sub> *pH* 4 versetzt und 2 mal mit je 3 ml Chloroform extrahiert. Die Chloroformphasen werden zusammengegeben und das Chloroform bei 40 °C mit N<sub>2</sub> abgeblasen. Der Rückstand wird in 200 µl 0,1%-Essigsäure<sub>aq</sub> aufgenommen und die Lösung nach Ultrazentrifugation zur HPLC-Analyse eingesetzt.

#### *Chromatographie*

Säule: Purospher RP 18, 5 µm, 125 mm × 3 mm. Flussrate: 0,6 ml/min. Säulenofen: 40 °C. Injektionsvolumen: 15 µl. Eluent A: 0,02 M Phosphorsäure<sub>aq</sub>-Lösung; Eluent B: Acetonitril. Gradient:  $t = 0$  min, 90% A : 10% B →  $t = 8$  min, 80% A : 20% B →  $t = 19$  min, 35% A : 65% B →  $t = 21$  min, 10% A : 90% B →  $t = 24$  min, 10% A : 90% B →  $t = 27$  min, 90% A : 10% B.

#### *Detektion*

FLD,  $\lambda_{\text{Anregung}} = 288$  nm,  $\lambda_{\text{Emission}} = 444$  nm.

#### *Quantifizierung und Leistungsdaten*

Quantifizierung erfolgte über eine Matrix-angepasste Kalibrierkurve. Leistungsmerkmale des Verfahrens (bezogen auf die Analyse von Trockensubstanz):  $NG = 10$  µg/kg,  $BG = 30$  µg/kg.

### **B.2.2 Untersuchung von Pflanzenproben mittels LC-MS**

#### *Aufarbeitung*

1 g Probe (Trockensubstanz) werden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen. Nach Zugabe von 5 ml Extraktionslösung (Aceton/H<sub>2</sub>O/(NH<sub>4</sub>)<sub>aq</sub>, 50 : 25 : 25) wird der Ansatz 5 min in ein Ultraschallbad gestellt, dann 10 min geschüttelt und anschließend 10 min mit 4000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird entnommen und der Bodensatz mit weiteren 5 ml Extraktionslösung extrahiert. Die Überstände werden vereinigt und der organische Lösungsmittel-Anteil bei 40 °C mit N<sub>2</sub> abgeblasen. Der Ansatz wird mit 5 ml (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>aq</sub> *pH* 7,4 versetzt und 2 mal mit je 3 ml Chloroform extrahiert. Die Chloroformphasen werden zusammengegeben und das Chloroform bei 40 °C mit N<sub>2</sub> abgeblasen. Der Rückstand wird in 200 µl 0,1%-Essigsäure<sub>aq</sub> aufgenommen und die Lösung nach Ultrazentrifugation zur LC-MS-Analyse eingesetzt.

### *Chromatographie*

Säule: Prodigy 5  $\mu$  ODS 3100 A, 150 mm  $\times$  3 mm. Flussrate: 0,3 ml/min. Säulenofen: 40 °C. Injektionsvolumen: 40  $\mu$ l. Eluent A: 0,1% Essigsäure<sub>aq</sub>-Lösung; Eluent B: 0,1% Essigsäure<sub>MeOH</sub>-Lösung. Gradient:  $t = 0$  min, 90% A : 10% B  $\rightarrow t = 3$  min, 60% A : 40% B  $\rightarrow t = 8$  min, 65% A : 40% B  $\rightarrow t = 10$  min, 0% A : 100% B  $\rightarrow t = 15$  min, 0% A : 100% B  $\rightarrow t = 18$  min, 90% A : 10% B.

### *MS/MS-Datenakquisition*

ESI(+), MS<sup>2</sup>,  $m/z$  360  $\rightarrow m/z$  315-318.

### *Quantifizierung und Leistungsdaten*

Quantifizierung erfolgte über eine Matrix-angepasste Kalibrierkurve. Leistungsmerkmale des Verfahrens (bezogen auf die Analyse von Trockensubstanz):  $NG = 10 \mu\text{g/kg}$ ,  $BG = 30 \mu\text{g/kg}$ .

## C Literaturverzeichnis

- [1] Halling-Sørensen, B., Nielsen, N. S., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H. C., Jørgensen, S. E., *Chemosphere* 1998, 357-393.
- [2] Hamscher, G., Sczesny, S., Abu-Qare, A., Höper H., Nau, H., *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 2000, 107, 332-334.
- [3] Hamscher, G., Sczesny, S., Höper H., Nau, H., *Anal Chem* 2002, 74, 1509-1518.
- [4] Thiele-Bruhn, S., *J Plant Nutr Sci* 2003, 166, 145-167.
- [5] Diaz-Cruz, M. S., Lopez de Alda, J., Barcelo, D., *Trends Anal Chem* 2003, 22, 340-351.
- [6] Grote, M., Schwake-Anduschus, C., Stevens, H., Michel, R., Betsche, T., Freitag, M., *J Verbrauch Lebensm* 2006, 1, 38-50.
- [7] Freitag, M., Yolcu, D. H., Hayen, H., Betsche, T., Grote, M., *J Verbrauch Lebensm* 2008, 3, 174-184.
- [8] Efron, B., Tibshirani, R. J., *An introduction to the bootstrap* 1993, Chapman and Hall/CRC.