

# **Modellstudien zur Aufnahme antimikrobiell wirkender Stoffe in Gemüse aus Gülle-gedüngtem Boden**

Von der Fakultät für Naturwissenschaften  
Department Chemie  
der Universität Paderborn

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von Inga Michels  
M.Sc. in Biochemie  
aus Salzkotten

Paderborn 2016

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2010 bis Dezember 2013 an der Universität Paderborn im Fach Anorganische und Analytische Chemie des Departments Chemie in der Fakultät für Naturwissenschaften unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Grote angefertigt.

Die Arbeit wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Forschungsverbundes RESET (ESBL und Fluorchinolon-Resistenz in Enterobacteriaceae, Laufzeit: 01. 11. 2010 – 31. 12. 2013, Teilprojekt 8, Förderkennzeichen 01K11013F) gefördert.

1. Referent: Prof. Dr. M. Grote

2. Referent: Prof. Dr. H. Hesecker

Eingereicht am: 13.04.2016

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2016

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit:

I. Michels, F. Chowdhury, H. Stevens, M. Freitag, M. Grote, A. Frieze, U. Rösler; *Aufnahme antimikrobiell wirkender Stoffe in Gemüse aus Gülle gedüngtem Boden und mikrobiologische Effekte – Methoden und Ergebnisse der Anbauperiode 2011*, Verbraucherschutz in DART: Forschungserkenntnisse und –perspektiven zu Antibiotikaresistenzen, Berlin 22. - 23. Mai 2012, Bundesinstitut für Risikobewertung (Poster)

I. Michels, F. Chowdhury, A. Frieze, U. Rösler, M. Freitag, M. Grote: *Incorporation of antimicrobial agents into vegetable from manured soil and microbiological effects*, „Pharmaceuticals in Soil, Sludge and Slurry“, Dessau-Roßlau 18. - 19. Juni 2013, Umweltbundesamt (Poster)

M. Grote, F. Chowdhury, I. Michels, H. Stevens, D. H. Meriç, M. Freitag, *Untersuchungen zur Aufnahme antibiotisch wirksamer Stoffe in Nutzpflanzen*, in: „Verbraucherschutz in DART: Forschungserkenntnisse und –perspektiven zu Antibiotikaresistenzen“, Berlin 22.–23. Mai 2012, Bundesinstitut für Risikobewertung, Tagungsband S. 45

M. Grote, F. Chowdhury, D. H. Meriç, I. Michels, C. Schwake-Anduschus, G. Langenkämper, C. Sprenger, M. Freitag: *Antibiotic Residues in Vegetables*; „Antibiotics in the Food Chain – Max Rubner Conference 2012“, Karlsruhe 08. – 01. Oktober 2012, Max Rubner Institut, Tagungsband S. 13

Aufnahme antimikrobiell wirkender Stoffe in Gemüse aus Gülle-gedüngtem Boden und mikrobiologische Effekte / Autor: Manfred Grote ; ausführende Institution: Universität Paderborn, Fakultät für Naturwissenschaften, Department Chemie [2014] in:

ESBL und Fluorchinolon-Resistenz in Enterobacteriaceae : RESET : Schlussbericht an das Deutsche Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V., DLR : Laufzeit: 1. November 2010-31. Dezember 2013 / Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung, WHO-Collaborating Centre for Research and Training in Veterinary Public Health, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; Koordinator: Lothar Kreienbrock; Förderkennzeichen BMBF 01KI1013 A-H. - Verbund-Nummer 01080383;

<http://opac.tib.uni-hannover.de/DB=1/XMLPRS=N/PPN?PPN=845652613>

E. Ullrich, I. Michels, S. Rohde, I. Müller, G. Hanschmann, J. Pößneck, C. Reuschel, F. Talhofer: *Antibiotika aus der Nutztierhaltung in der Umwelt*, Schriftenreihe des Sächsischen Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie (LfULG), (in Vorbereitung, danach online verfügbar: [https:// publikationen.sachsen.de/bdb/](https://publikationen.sachsen.de/bdb/))

Hiermit versichere ich, Inga Michels, dass ich die vorliegende Arbeit „*Modellstudien zur Aufnahme antimikrobiell wirkender Stoffe in Gemüse aus Gülle-gedüngtem Boden*“ persönlich und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe, sowie zur Hilfeleistung herangezogene Personen und Institutionen vollständig genannt sind. Die Arbeit ist zuvor keiner Prüfungsbehörde in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegt worden.

Paderborn, den 13.04.2016

Inga Michels

## Danksagung

---

Herrn Prof. Dr. Manfred Grote danke ich sehr herzlich für die überaus interessante Themenstellung dieser Arbeit und seine engagierte langjährige Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Helmut Hesecker danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Frau Prof. Dr. Mechthild Freitag, Fachhochschule Südwestfalen, Abteilung Soest, ihren MitarbeiterInnen, darunter insbesondere Katharina Grohne und den Mitarbeitern des Versuchsguts Merklingsen danke ich für die Planung, Betreuung und tatkräftige Hilfe bei der Durchführung der Feldversuche. Herrn Sebastian Hötte danke ich für die Zurverfügungstellung der Wetterdaten.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Uwe Rösler, FU Berlin und seinen MitarbeiterInnen, insbesondere bei Frau Dr. Anika Friese, für die mikrobiologischen Untersuchungen im Rahmen des RESET-Teilprojektes 8, sowie Auswertung und Bewertung der Messdaten bedanken.

Herrn Dr. Hubert Bode danke ich für die Unterstützung bei der Beschaffung von Antibiotika für die Feldversuche.

Herrn Junior-Prof. Dr. Joachim Aurbacher, JLU Gießen, danke ich für die Erstellung eines Perl-Skriptes, ohne das mir die Auswertung der Massenspektren mittels *spectral counting* nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt den MitarbeiterInnen des Arbeitskreises, Dr. Farzana Chowdhury, Dr. Didem H. Meriç, Dr. Henning Stevens und Sophie Zimmermann, für die stete Hilfsbereitschaft und sehr angenehme Atmosphäre.

## Kurzfassung

---

Mit tierischen Exkrementen, die als Wirtschaftsdünger angewendet werden, gelangen die nach Medikation ausgeschiedenen Antibiotika sowie resistente Bakterien auch auf Gemüsesfelder. Vorstudien ergaben, dass ein Transfer antibiotisch wirksamer Stoffe aus dem Boden in Nutzpflanzen möglich ist. Daher sind als Eintragsquelle für Antibiotika in die Nahrungsmittelkette auch kontaminierte Gemüse in Betracht zu ziehen.

Um Erkenntnisse über die Kontamination von verzehrstarken Gemüse durch Antibiotika und resistente Bakterien zu gewinnen, wurden im Rahmen des BMBF-Forschungsverbundes RESET („ESBL und Fluorchinolon-Resistenz in *Enterobacteriaceae*“) in zwei Anbauperioden Weißkohl und Porree in konventioneller Landwirtschaft auf Versuchsparzellen (FH Südwestfalen, Soest) angepflanzt. In praxisüblichen Aufwandmengen wurde mit tierischen Exkrementen aus der Schweine- und Geflügelhaltung gedüngt. Die Exkremente waren vor der Ausbringung definiert mit Antibiotika (Tetracyclin, Enrofloxacin, Amoxicillin oder Cefotiofur: je 75 mg/kg) und ESBL/PMQR-*Escherichia coli* ( $10^3$  KBE/mL) dotiert worden. Zur rückstandsanalytischen Bestimmung der Gehalte an Antibiotika und Umwandlungsprodukten in Gülle, Boden und Ernteproben, wurden LC-MS-Methoden entwickelt. Ebenso erfolgten bakteriologische Analysen auf resistente Mikroorganismen (FU Berlin).

Im Porree und Weißkohl, die auf mit Enrofloxacin-dotierter Schweinegülle oder Hühnerkot gedüngten Parzellen angebaut worden waren, wurden im essbaren Teil ENR-Gehalte bis zu 0,3 µg/kg FG (Frischgewicht) nachgewiesen. Die Düngung mit Tetracyclin-dotierten Tierexkrementen führte beim Porree in jungen Blättern zu einer Belastung von maximal 5 µg/kg FG. Gemüsepflanzen beider Anbauperioden enthielten in Wurzeln und verzehrbaren Bestandteilen Tetracyclin- und ENR-Spuren, aber keine messbaren  $\beta$ -Lactam-Rückstände. Auswertelgorithmen von *full*-MS-Spektren führten jedoch zu Hinweisen auf Umwandlungs- und Abbauprodukte von Amoxicillin und Cefotiofur in Pflanzen, Boden und Gülle.

Sowohl aus dem Boden als auch aus Gemüsepflanzen der Versuchsparzellen wurden resistente Mikroorganismen isoliert. Anscheinend überlebten die zur Gülle dotierten Resistenzen im Boden die fünfmonatige Anbauperiode. Der organisch gedüngte Boden stellt somit ein Reservoir für (Multi-)Resistenzen in der Umwelt dar. Eine weitere Folgerung aus den Ergebnissen der Rückstandsanalysen und der mikrobiologischen Untersuchungen ist, dass Konsumenten von konventionell angebautem Gemüse sowohl Antibiotikarückständen als auch resistenten Bakterien ausgesetzt sein können. Die Frage, ob in Nutzpflanzen inkorporierte Antibiotika nach Verzehr in subinhibitorischer Konzentration zur Bildung von Resistenzen führen können, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen im Rahmen des Forschungsverbundes RESET-II.

## Abstract

---

A potentially large source of antibiotics and resistant bacteria is livestock waste, distributed on fields as fertilizer. Former investigations show the incorporation of antibiotics into various crops under hydroponic and field conditions. In particular the role of frequently consumed vegetables as carrier of antibiotic contaminants as well as multiresistant pathogenic bacteria, requires clarification. In order to assess possible consequences with regard to food safety in two cultivation periods leek and white cabbage were grown on experimental plots. Excrements from pigs and poultry were spiked separately with enrofloxacin (ENR), tetracycline (TC), amoxicillin (AMO) or ceftiofur (CEF), each 75 mg/kg. Furthermore extended-spectrum- $\beta$ -lactamases (ESBL) producing and fluorquinolon resistant (PMQR) *E. coli* ( $10^3$  cfu/ml) were added to the manure and then applicated to the fields combined with the antibiotics. Analytical methods (LC/MS) were developed to determine extractable amounts of antibiotics (active compounds and metabolites) in various organs of harvested plants, soil and excreta. In addition, microbiological studies were carried out.

The content of antibiotic residues in the vegetables was generally low. However, in the edible parts ENR concentrations up to 0.3  $\mu\text{g/kg}$  fw were found. The fertilization with tetracyclin-spiked animal excrements resulted in 5  $\mu\text{g/kg}$  fw in young leaves of leek. ESBL/PMQR-*E. coli* findings in/on plant seedlings and in/on leaves of a cabbage sample (ENR-spiked manure) are noticeable. Vegetable plants of both cultivation periods contained none  $\beta$ -lactam-residues. Specially tailored evaluations of full-MS-data (*spectral counting*) indicate products of degradation and conversion of AMO and CEF in plants, soil and manure. The microbiological studies lead to several positive findings of ESBL-*E. coli* in soil, roots and plants. Obviously, *E. coli* originally occurring in manure seem to survive in the soil over the whole sampling period of nearly five months. The organic fertilized ground shows therefore a reservoir for (multi)-resistance in the environment. As a consequence of the results, the distribution of both antibiotic active compounds and multi-resistant populations from animal husbandry via nutrition plants into the food chain might be possible. Further studies (RESET II, IP 7) will investigate possible effects of these contaminations.

# Inhaltsverzeichnis

---

Danksagung.....	5
Kurzfassung.....	6
Inhaltsverzeichnis .....	8
Abkürzungsverzeichnis .....	10
1      Einleitung .....	13
2      Zielsetzung.....	15
3      Theoretischer Teil .....	16
3.1    Antibiotika .....	16
3.1.1 $\beta$ -Lactame.....	22
3.1.2   Chinolone.....	24
3.1.3   Tetracycline.....	25
3.2    Antibiotikaresistenz.....	25
3.3    Strategien, Studien und gesetzliche Regelungen.....	31
3.3.1   Antibiotikaresistenzstrategie DART .....	31
3.3.2   Tierarzneimittel-Abgabemengenregister der Veterinärmedizin nach der DIMDI- Arzneimittelverordnung.....	33
3.3.3   Studie zum Antibiotikaverbrauch in niedersächsischen Mastbetrieben .....	34
3.3.4   Studie zum Antibiotikaeinsatz in Masthähnchenbetrieben in Nordrhein- Westfalen .....	35
3.3.5   Forschungsprojekt VetCAB (Veterinary Consumption of Antibiotics) .....	35
3.3.6   Privatwirtschaftliche Initiative QS (Qualität und Sicherheit) .....	36
3.3.7   16. Novelle des Arzneimittelgesetzes, HIT-Datenbank.....	37
3.3.8   Antibiotikaverbrauch und Verbreitung von Resistenzen, GERMAP .....	38
3.3.9   Resistenzen in der Veterinärmedizin, GERM-Vet.....	39
3.3.10   Antibiotikaresistenzen in der Lebensmittelkette, DARLink.....	40
3.3.11   Antibiotikaverbrauch und Maßnahmen in EU-Ländern, ESVAC .....	41
3.3.12   EU-Behörden.....	47
3.4    Antibiotika in der Umwelt .....	48
3.4.1   Antibiotika in Wirtschaftsdünger .....	50
3.4.2   Antibiotika im Boden.....	53
3.4.3   Antibiotika in Pflanzen.....	56
3.4.4   Hydrokulturexperimente zur potentiellen Aufnahme von Antibiotika in Porree und Weißkohl.....	61



4	Überblick zum methodischen Vorgehen.....	63
5	Ergebnisse und Diskussion .....	64
5.1	Durchführung der Feldversuche - Einflüsse der Wetterbedingungen .....	64
5.2	Verfahrensweise zur Anbauperiode 2011 .....	66
5.2.1	Methodenentwicklung zur Bestimmung der Antibiotikagehalte in Pflanzen und Boden .....	76
5.2.2	Ergebnisse der Rückstandsanalysen der Anbauperiode 2011.....	77
5.2.3	Mikrobiologische Untersuchungen 2011.....	82
5.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse des Feldversuchs 2011 .....	84
5.3	Verfahrensweise Anbauperiode 2012 .....	86
5.3.1	Methodenentwicklung zur Bestimmung der Ceftiofurgehalte in Pflanzen.....	90
5.3.2	Ergebnisse der Rückstandsanalysen der Anbauperiode 2012.....	98
5.3.3	Verhalten von CEF und AMO in Gülle und Boden: Sorptionsstudien.....	104
5.3.4	„Spectral Counting“: Hinweise auf Umwandlungs- und Abbauprodukte von CEF und AMO .....	106
5.3.6	Mikrobiologische Untersuchungen 2012 .....	129
5.4	Zusammenfassung der Ergebnisse des Feldversuchs 2012 und ergänzender Untersuchungen – Fazit.....	132
6	Zusammenfassung .....	137
7	Literatur .....	140
	Anhang: experimenteller Teil.....	158
A.	Feldversuche .....	158
B.	Antibiotikarückstandsanalytik .....	163
C.	Perl Skript für das „Spectral Counting“ .....	183

# Abkürzungsverzeichnis

---

ACN	Acetonitril
AMA	Penicilloinsäure von Amoxicillin
AMG	Arzneimittelgesetz
AMO	Amoxicillin
AMTA	2-Amino- $\alpha$ -(methoxyimino)-4-thiazolacetamid
BBCH	(Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Bundessor- tenamt und Chemische Industrie) Codierung der phänologischen Ent- wicklungsstadien von Pflanzen
bidest. Wasser	bidestilliertes Wasser
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BG	Bestimmungsgrenze
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CEF	Ceftiofur
CIA	<i>critically important antimicrobials</i> (Reserveantibiotika mit hoher Priori- tät für die Humanmedizin, eingestuft von der WHO)
CIP	Ciprofloxacin
CTC	Chlortetracyclin
Da	Dalton (in der Biochemie genutzter Name für die atomare Massenein- heit)
DAD	Diodenarray-Detektor
DARLink	Deutsche Antibiotikaresistenzsituation in der Lebensmittelkette
DART	Deutsche Antibiotika Resistenzstrategie
DCA	Desfuroylceftiofuracetamid
DFC	Desfuroylceftiofur
Diketo	Diketopiperazin von Amoxicillin
DIMDI-AMV	Verordnung über das datengestützte Informationssystem über Arznei- mittel des Deutschen Instituts für medizinische Dokumentation und In- formation
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DTE	Dithioerythritol
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> (Europäisches Zent- rum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten)
ECOFF	<i>epidemiological cut-off value</i> (epidemiologischer Grenzwert, Angrenzung der Wildtyppopulation zur beginnenden Antibiotikaresistenz)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Europäische Agentur für Lebensmittelsi- cherheit)
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Europäische Arzneimittelagentur)
ENR	Enrofloxacin
ESBL	<i>extended spectrum <math>\beta</math>-lactamase</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
ESVAC	European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (Europäische Überwachung des Arzneimittelverbrauchs in der Veterinärmedizin)
e-TC	epi-Tetracyclin
EU	Europäische Union
EUCAST	<i>The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> (europä- isches Komitee für antimikrobielle Sensibilitätstests)
FA	Ameisensäure

FG	Frischgewicht
FLD	Fluoreszenz-Detektor
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
GERMAP	Antibiotikaresistenzatlas ( <a href="http://www.p-e-g.org/econtext/germap">http://www.p-e-g.org/econtext/germap</a> )
GERM-Vet	<i>German Resistance Monitoring</i> (nationales Resistenzmonitoring tierpathogener Erreger)
GK	Geflügelkot, in dieser Arbeit: Hühnerkot
HIT	Herkunfts- und Informationssystem für Tiere
HPLC	<i>high-performance-liquid-chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie)
IAA	Iodacetamid
IUPAC	<i>International Union of Pure And Applied Chemistry</i>
IWW	Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasser Beratungs- und Entwicklungsgesellschaft mbH, Biebesheim am Rhein
KbE	Kolonie-bildende Einheit (Maßeinheit für Bakterien)
KG	Körpergewicht
LB	<i>lysogeny broth</i> , Name eines Standardmediums für die Bakterienkultur
LC	<i>liquid chromatography</i> (Flüssigchromatographie)
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
LUFA NRW	Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt NRW
LMA	Fließmittel A für die HPLC
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization</i> (Ionisierungstechnik in der Massenspektrometrie)
MEC	<i>measured environmental concentration</i> (gemessene Konzentration in der Umwelt)
MeOH	Methanol
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
MRSA	Methicillin-resistente- <i>Staphylococcus-aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
n.b.	nicht bestimmt
n.n.	nicht nachgewiesen
n	Anzahl der Injektionen (Messprobe LC-MS/MS)
N	Anzahl der Probenaufbereitungen
NWG	Nachweisgrenze
oD	ohne Dotierung von Antibiotika
OPI-SPE	<i>Over Pressure Inline Solid-Phase-Extraction</i>
ox-CEF	oxidiertes Ceftiofur (Umwandlungsprodukt von CEF)
P	Porree
p.a.	pro analysi
PCU	<i>population correction unit</i> (Einheit für das Gesamtgewicht eines Viehbestandes)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEC	<i>predicted environmental concentration</i> (vorhergesagte/errechnete Umweltkonzentration)
PMQR	<i>plasmid-mediated quinolone resistance</i> (Fluorchinolonresistenz, die auf einem Plasmid lokalisiert ist)
PNEC	<i>predicted no effect concentration</i> (vorhergesagte Konzentration, bei der sich voraussichtlich keine nachteiligen Effekte ergeben)
QS	Qualität und Sicherheit (privatwirtschaftliche Initiative zur Erfassung von Antibiotikaeinsatzmengen)

RESET	ESBL und Fluorchinolon- <b>Resistenz</b> in <b>Enterobacteriaceae</b> , Laufzeit: 01. 11.2010 – 31. 12.2013; BMBF-gefördertes Verbundprojekt
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
t-RNA	transfer-RNA
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SFD	Sulfadiazin
SG	Schweinegülle
SPE	<i>solid phase extraction</i> (Festphasenextraktion)
SRM	<i>selective reaction mode</i> (Modus bei der Aufnahme der Massenspektren)
TAMMitDurchfV	Tierarzneimitteldurchführungsverordnung
TAR	Tierarzneimittel-Abgabemengen-Register
TC	Tetracyclin
TCA	Trichloressigsäure
TIC	<i>total ion current</i> (Totalionenchromatogramm)
TiHo	Tierärztliche Hochschule
TM	Trockenmasse
TOF	<i>time of flight</i> (Flugzeit)
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
UBA	Umweltbundesamt
VetCab	<i>Veterinary Consumption of Antibiotics</i> (Forschungsprojekt zur Erfassung von Antibiotikaeinsatzmengen)
WHO	<i>World Health Organization</i>
Wk	Weißkohl

# 1 Einleitung

---

*“But I would like to sound one note of warning. Penicillin is to all intents and purposes non-poisonous so there is no need to worry about giving an overdose and poisoning the patient. There may be a danger, though, in underdosage. It is not difficult to make microbes resistant to penicillin in the laboratory by exposing them to concentrations not sufficient to kill them, and the same thing has occasionally happened in the body.”*

Alexander Fleming, Nobelpreisrede 1945 [1]

Die Entdeckung der Antibiotika war eine der größten Entdeckungen in der Medizin. Doch bereits Alexander Fleming warnte, nur wenige Jahre nach der ersten Anwendung von Penicillin (1941), vor falschem Einsatz und der Gefahr der Resistenz: Jede Anwendung von Antibiotika in der Veterinär- und der Humanmedizin birgt das Risiko, dass Bakterien gegen antimikrobiell wirksame Stoffe resistent werden und die Wirkung von Antibiotika abnimmt [1]. Die Häufigkeit von bakteriellen Erregern, die Resistenzen gegen Antibiotika aufweisen, hat in den letzten Jahrzehnten weltweit zugenommen. Diese Zunahme stellt die Human- und Veterinärmedizin sowie die gesamte Gesellschaft vor eine große Herausforderung [2].

Ein Großteil der zur Behandlung eingesetzten Pharmaka und ihre Metabolite werden von Mensch und Tier wieder ausgeschieden [3, 4]. Durch das kommunale Abwassersystem und die Ausbringung von Wirtschaftsdüngern auf landwirtschaftlich genutzte Flächen gelangen Arzneimittel in die Umwelt [5–9]. Durch die Güllebeaufschlagung kann es zur Hemmung der Bioaktivität des Bodens kommen. Es ist auch möglich, dass Antibiotika und Bakterien in tiefere Bodenschichten ausgewaschen werden. Eine Resistenzübertragung wurde dabei nicht beobachtet [10–13]. Auch nach mehreren Monaten sind Antibiotika im Boden noch nachweisbar. Antibiotika, die mit der Gülle in den Boden gelangen, können von Pflanzen aufgenommen werden [14, 15]. Abhängig von unterschiedlichen Bedingungen (Wetter, Boden, Antibiotikagehalt in der Gülle) sind Tetracycline im Getreide nachzuweisen [16, 17]. Somit besteht die Möglichkeit, dass der Mensch neben tierischen Produkten auch durch pflanzliche Lebensmittel ungewollt Antibiotika aufnimmt. Die grundsätzliche Aufnahme von Antibiotika über die Pflanzenwurzeln wurde bereits 1958 experimentell erkannt [18]. Die relativ lange Wachstumszeit und der große Nährstoffbedarf einiger Gemüsearten („Starkzehrer“, wie z.B. Kohlsorten und Porree) könnten den möglichen Transfer begünstigen. Im Arbeitskreis durchgeführte Studien unter Hydrokulturbedingungen zeigten die Aufnahmefähigkeit von Antibiotika in Pflanzen [19, 20]. Diese Aufnahmefähigkeit konnte für Rotkohl auch unter Freilandbedingungen beobachtet werden [21].

Rückstandshöchstmengen, wie sie es für Fleisch, Eier und Milch gibt [22], wurden bisher nicht festgelegt, unter anderem ist dies durch die schmale Datenlage begründet [23].

Neben den Antibiotikarückständen dringen ebenso Mikroorganismen, die gegebenenfalls Resistenzen tragen, durch Güllebeaufschlagung in den Boden. Außerdem ist eine Resistenzinduktion aufgrund der eingetragenen Antibiotika denkbar. Die Resistenzfaktoren könnten sich danach auch in den natürlich vorkommenden Populationen verbreiten. Zusammen mit den bereits vorhandenen intrinsischen Resistenzen bilden Bodenbakterien so ein Reservoir für Resistenzgene mit hoher genetischer Diversität [24, 25]. Wechselwirkungen wurden bis zum subinhibitorischen Konzentrationsbereich, also unterhalb der wirksamen, Selektionsdruck erzeugenden Konzentration, beobachtet [26, 27]. Die Auswirkungen derartiger, möglicherweise synergistischer Effekte von Bakterien und Antibiotika auf landwirtschaftlich genutzte Böden sind noch nicht abschätzbar [28–30]. Durch die auf diesen Böden angebauten Pflanzen, die als Futter- und Lebensmittel verwendet werden, kann so auch eine Gefahr für den Menschen am Ende der Nahrungsmittelkette entstehen.

Vor dem Hintergrund der drastischen Zunahme an bakteriellen Krankheitserregern, die gegen Antibiotika resistent sind, ist der unkontrollierte Eintrag von Veterinärantibiotika über Nutzpflanzen in die Nahrungskette und in Futtermittel kritisch zu bewerten. Nach Aussage des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) im Februar 2010 ist „die Frage der Resistenzentwicklung und -ausbreitung unter Einwirkung einzelner oder mehrerer antibiotischer Wirkstoffe gleichzeitig in geringen Konzentrationen und über längere Zeiträume nicht hinreichend wissenschaftlich bearbeitet“ [31]. Auch gegenwärtig ist das Risiko der Resistenzentstehung aufgrund der Aufnahme geringer Antibiotikamengen durch pflanzliche Lebensmittel nicht geklärt.

Der Forschungsverbund RESET („ESBL und Fluorchinolon-**Resistenz** in **Enterobacteriaceae**“, Koordination: Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) beschäftigt sich mit der Erforschung, Entstehung und Verbreitung von Resistenzen gegen Antibiotika, schwerpunktmäßig bei Bakterien der Familie Enterobacteriaceae. Dazu zählen u.a. *Escherichia coli* und *Salmonella enterica*, die bei Mensch und Tier und ubiquitär in der Umwelt vorkommen. Insbesondere besteht die Aufgabe des Verbundes darin, eine umfassende Kenntnis der Verbreitung von  $\beta$ -Laktamasen, wie ESBLs (*extended-spectrum  $\beta$ -lactamases*), und Fluorchinolonresistenz, wie PMGR, bei *E. coli* und *S. enterica* zu gewinnen [32].

Im Teilprojekt 8 des „RESET-Verbundpartners Universität Paderborn“ in Kooperation mit der FH-Südwestfalen mit dem Titel: „Aufnahme antimikrobiell wirkender Stoffe in Gemüse aus Gülle-gedüngtem Boden und mikrobiologische Effekte“, wurden u.a. die in dieser Arbeit beschriebenen Modellversuche durchgeführt, bei dem sowohl rückstandsanalytische als auch mikrobiologische Fragestellungen berücksichtigt wurden.

## 2 Zielsetzung

---

Die Rolle von Nutzpflanzen als Reservoir von Antibiotikarückständen und (Multi-)Resistenz tragenden Bakterien, wie ESBL-produzierende *E. coli*, erfordert Aufklärung: Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass subinhibitorische Konzentrationen an Antibiotika in Nutzpflanzen zur Entwicklung von Antibiotikaresistenzen beim Menschen beitragen. Um mögliche Konsequenzen im Hinblick auf die Lebensmittelsicherheit zu erkennen, soll das Aufnahmepotential von Antibiotika in Gemüse während zwei praxisnahen, modellartigen Feldversuchen im Rahmen des RESET-Projektes untersucht werden. Bereits in vorhergehenden Studien konnte nachgewiesen werden, dass in Gebieten mit hohem Viehbestand Antibiotika aus Gülle gedüngtem Boden von Weizenpflanzen über die Wurzel aufgenommen und bis in das Getreidekorn transportiert werden können [10, 12, 16, 17, 19].

Der Anbau von Gemüse im Feldversuch dient

- der Untersuchung der Aufnahme repräsentativer Veterinärwirkstoffe der Schweine- und Geflügelhaltung (Tetracyclin, Enrofloxacin, Amoxicillin, Ceftiofur) aus Gülle-gedüngtem Boden über die Wurzeln von Porree und Weißkohl,
- der Untersuchung der Verlagerung und Verteilung von Antibiotika in Pflanzenorganen, insbesondere den essbaren Teilen, um Hinweise auf die mögliche Exposition des Verbrauchers durch Antibiotika-belastete pflanzlichen Lebensmittel zu erhalten,
- der Untersuchung des Verbleibs von ESBL- und PMQR (*Plasmid-Mediated Quinolone Resistance*)-produzierenden *E. coli* im Boden und der möglichen Kontamination von Nutzpflanzen.

Dazu sind geeignete Methoden für die Rückstandsanalyse von Antibiotika in Nutzpflanzen, Boden und Gülle zu entwickeln, zu evaluieren und anzuwenden. Mikrobiologische Untersuchungen des Kooperationspartners FU Berlin sollten die Rückstandsanalytik ergänzen.

## 3 Theoretischer Teil \*

---

### 3.1 Antibiotika

Der Wortursprung von Antibiotika ist griechisch und kann mit „Stoff gegen das Leben“ übersetzt werden [33]. Im ursprünglichen Sinn sind Antibiotika natürlich gebildete Stoffgruppen niedermolekularer Metabolite aus dem Sekundärstoffwechsel von Mikroorganismen (hauptsächlich Bodenbakterien wie *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. und Pilze) mit einer Molekularmasse von 2000 Da. Antibiotika hemmen bereits in sehr geringen Konzentrationen, mit weniger als 200 ng/mL, das Wachstum anderer Mikroorganismen (z.B. Bakterien), beeinträchtigen den produzierenden Mikroorganismus selbst aber nicht. Antibiotika werden von Mikroorganismen nicht nur zur Abwehr anderer Organismen gebildet, sondern möglicherweise ist die wichtigere Aufgabe von Antibiotika als Signalmoleküle zur intra- und interspezifischen Kommunikation zu wirken [34]. Darüber hinaus werden nach dem natürlichen Vorbild Antibiotika partiell oder vollständig synthetisch hergestellt.

#### *Einteilung und Wirkung*

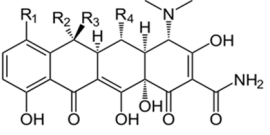
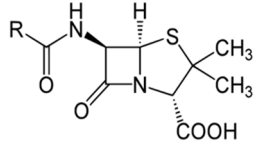
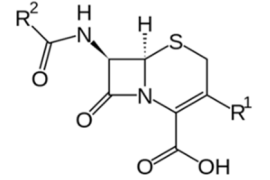
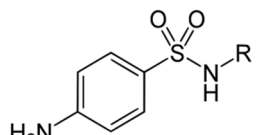
Antibiotika können nach ihrer chemischen Struktur, nach ihren Angriffsorten/ihrem Wirkmechanismus oder nach ihrer Wirkung/Wirksamkeit unterschieden werden. Am gebräuchlichsten ist die Einteilung nach ihrer chemischen Struktur, dementsprechend die Einteilung in Antibiotikaklassen (siehe Tabelle 1).

---

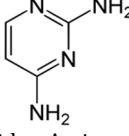
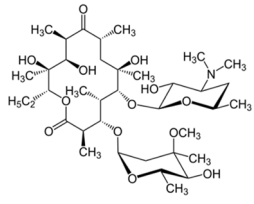
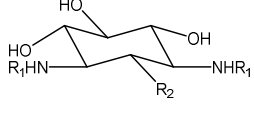
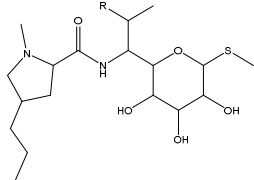
\* in Anlehnung an den theoretischen Teil der Schriftenreihe Antibiotika aus der Nutztierhaltung in der Umwelt [35]



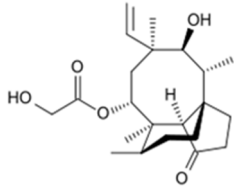
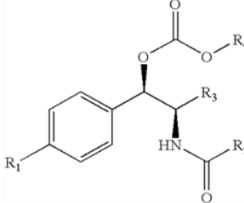
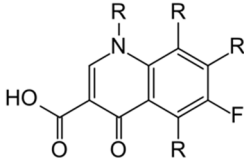
**Tabelle 1: In der Tiermedizin eingesetzte Antibiotika-Wirkstoffgruppen, geordnet nach Einsatzhäufigkeit [2, 36, 37]**

Anti-biotika-klasse	Chemische Struktur	Wirkung	Wirkprinzip	Indikation	Antibiotika (Beispiele)
Tetracycline		bakteriostatisch	Hemmung der Proteinsynthese	Infektion des Atmungs-, Verdauungs- und Urogenitalsystems, sowie der Haut starker Einsatz bei Masttieren	Chlortetracyclin, Doxycyclin, Oxytetracyclin, Tetracyclin, Demeclocyclin, Meclocyclin, Metacyclin
β-Lactame		bakterizid	Störung der Zellwandsynthese	Benzylpenicilline: Atemwegsinfektionen, eitrige Infektionen	Benzylpenicillin, Penethamathydriodid
				Aminopenicilline: an erster Stelle bei Mastgeflügel, -schwein und -kalb bei Infektionen, Euterentzündung, spezielle Infektionskrankheiten wie Rotlauf, Listeriose	Amoxicillin, Ampicillin,
				Isoxazolylpenicilline: Euterentzündung, Infektion des Uterus, Augeninfektion	Cloxacillin, Oxacillin, Dicloxacillin
					Nafcillin, Penicillin V
		bakterizid	Störung der Zellwandsynthese	Reserveantibiotikum in der Humanmedizin	Cefalexin, Cefapirin, Cefazolin, Cefoperazon, Cefquinom, Ceftiofur, Cefalonium
Sulfonamide		bakteriostatisch	Störung der Folsäuresynthese	starker Einsatz bei Masttieren gegen Infektionen des Atmungs- und Verdauungstraktes, Listeriose; einzige Antibiotika mit Wirkung gegen Protozoen (Kokzidien bei Geflügel, Kalb)	Sulfaclozin, Sulfadiazin, Sulfadimethoxin, Sulfadimidin, Sulfadoxin, Sulfamerazin, Sulfamethoxazol, Sulfamethoxypyridazin, Sulfaquinoxalin, Sulfathiazol, Sulfapyridin, Sulfaisoxazole

**Fortsetzung Tabelle 1: In der Tiermedizin eingesetzte Antibiotika-Wirkstoffgruppen, geordnet nach Einsatzhäufigkeit [2, 36, 37]**

Antibiotika-klasse	Chemische Struktur	Wirkung	Wirkprinzip	Indikation	Antibiotika (Beispiele)
Diaminopyrimidine	 <p>die beiden Aminogruppen können auch an C5 oder C6 des Rings stehen</p>	bakterizid	Störung der Folsäuresynthese	eingesetzt in Kombination mit Sulfonamiden	Trimethoprim
Makrolide	 <p>Erythromycin A als Beispiel</p>	bakteriostatisch	Veränderung der Zellmembranpermeabilität	Atemwegsinfektionen, Euterentzündung	Erythromycin, Gamithromycin, Tildipirosin, Tilmicosin, Tulathromycin, Tylosin, Tylvalosin, Ivermectin, Spiramycin, Clarithromycin, Roxithromycin
Aminoglykoside		bakteriostatisch	Hemmung der Proteinsynthese	Infektionen des Atmungs-, Verdauungs- und Urogenitalsystems	Apramycin, Dihydrostreptomycin, Gentamicin, Kanamycin, Neomycin, Spectinomycin, Streptomycin
Polypeptide		bakterizid	Störung der Zellmembran	vor allem bei Infektionen des Verdauungstraktes mit Enterobakterien, wie <i>E. coli</i> , Salmonellen	Colistin
Lincosamide		bakteriostatisch	Störung der Proteinsynthese	vor allem bei Infektionen des Atmungssystems und gastrointestinalen Störungen verwendet; stark eingesetzt in der Geflügelmast	Lincomycin, Clindamycin, Pirlimycin

**Fortsetzung Tabelle 1: In der Tiermedizin eingesetzte Antibiotika-Wirkstoffgruppen, geordnet nach Einsatzhäufigkeit [2, 36, 37]**

Antibiotika-klasse	Chemische Struktur	Wirkung	Wirkprinzip	Indikation	Antibiotika (Beispiele)
Pleuromutiline		bakteriostatisch	Hemmung der Proteinsynthese	Infektionen des Verdauungs- und Atmungssystem	Tiamulin, Valnemulin
Fenicole		bakteriostatisch	Hemmung der Proteinsynthese	Infektion des Atmungstraktes	Chloramphenicol, Thiamphenicol, Florfenicol
Fluorchinolone		bakterizid	Hemmung der Replikation	Infektionen des Atmungs- und Verdauungstraktes	Danofloxacin, Difloxacin, Enrofloxacin, Marbofloxacin

Die Einteilung der Antibiotika nach ihrer Wirksamkeit ist folgendermaßen:

- bakteriostatisch:  
Bakterien werden an der Vermehrung gehindert. Die im Wachstum gestörten Krankheitserreger müssen von körpereigenen Abwehrmechanismen eliminiert werden.
- bakterizid:  
Durch Schädigung essentieller Bakterienzellstrukturen (z. B. der Bakterienzellwand) sterben die Erreger ab, sie sind aber weiterhin physisch vorhanden.
- bakteriolytisch:  
Bakterien werden getötet und deren Zellwand aufgelöst.

Die meisten Antibiotika wirken durch Störung der Proteinsynthese, indem sie an der großen Untereinheit des Ribosoms intervenieren und die Bindung der t-RNA verhindern [2, 38]. Antibiotika wirken dadurch gegen proliferierende und selten gegen ruhende Bakterien [36].

Molekulare Angriffsorte von Antibiotika sind:

- die Zellwandsynthese bei den Penicillinen und Cephalosporinen,
- Struktur und Funktion der DNA bei den Fluorchinolonen,
- die Folsäuresynthese bei den Sulfonamiden,
- die Proteinsynthese zu Beginn bei den Aminoglykosiden, im Mittelteil bei den Tetracyclinen und am Ende bei den Makroliden [39].

Nach ihrer Wirkungsweise werden Antibiotika wie folgt eingeteilt:

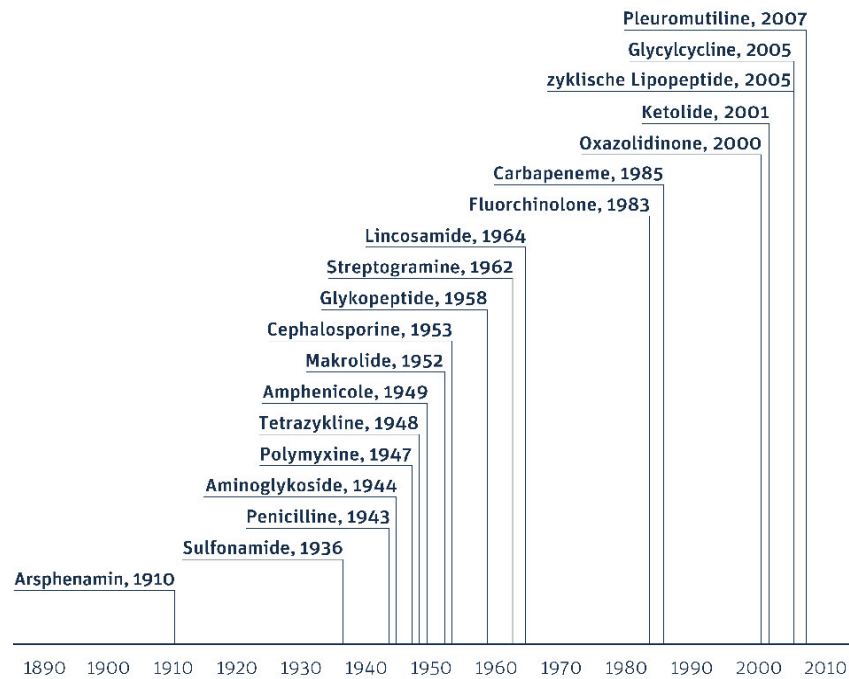
- Hemmung der Zellwandsynthese
- Interferenz mit der bakteriellen DNA bzw. RNA
- Hemmung der bakteriellen Proteinbiosynthese
- Hemmung der Kofaktorbiosynthese
- Membranporenbildung [40–42].

Von den Antibiotika wurden früher die Chemotherapeutika abgegrenzt, die synthetisch hergestellt werden und ebenso bei bakteriellen Infektionen zum Einsatz kommen. Die Begriffe Antibiotikum, Chemotherapeutikum, Antiinfektivum werden überwiegend parallel genutzt [43]. Im weiteren Sinne werden alle Substanzen, die gegen Mikroorganismen jedweder Form (Bakterien, Viren, Pilze) wirksam sind, unabhängig davon, ob sie hoch- oder niedermolekular, natürlicher oder synthetischer Herkunft sind, als Antibiotika verstanden. Je nach Umfang ihres Wirkspektrums werden die einzelnen antibiotischen Substanzen in Schmalband- (nur gegen einige wenige Mikroorganismen wirkend), Mittelband- oder Breitband-Antibiotika (gegen ein weites Spektrum wirkend) eingeteilt [36].

### *Antibiotikaforschung*

Die erste Beobachtung einer antibiotischen Wirkung anderer Mikroorganismen auf bestimmte Bakterien (Milzbranderreger) machte der französische Chemiker Louis Pasteur im 19. Jahrhundert. Etwa im Jahr 1900 isolierte der deutsche Bakteriologe Rudolf von Emmerich den antibiotischen Stoff Pyocyan, welcher im Laborversuch gegen Cholera und Diphtherie wirkte [44–46]. Das 1910 von Paul Ehrlich eingeführte Arsphenamin war zwar im Wirkungsspektrum auf Spirochäten begrenzt, es ermöglichte dadurch aber erstmals eine wirksame und relativ ungefährliche Therapie der damals weit verbreiteten Syphilis [47]. Der schottische Bakteriologe Alexander Fleming entdeckte 1928 zufällig Penicillin. Um 1935 gelang es Bayer bzw. Gerhard Domagk, das erste Sulfonamid, ein synthetisch entwickeltes Antibiotikum, herzustellen [48]. Die späteren, seit 1970, neu entwickelten Antibiotika basieren sämtlich auf den schon bekannten Antibiotikaklassen (siehe Abbildung 1).

Die neuen Antibiotika haben höhere mikrobielle Aktivität, weisen bessere pharmakokinetische Eigenschaften auf, umgehen bekannte Resistenzmechanismen oder sind sicherer. Zwischen 2000 und 2011 wurden weltweit zwanzig neue Antibiotika auf den Markt gebracht, elf davon basieren auf Naturprodukten und neun sind synthetisch entwickelt worden [49]. Sie wurden fast alle mit dem ausdrücklichen Ziel entwickelt, vorhandene Resistenzen zu überwinden



**Abbildung 1: Einführung neuer Antibiotikaklassen weltweit [49]**

Die Jahreszahlen in Abbildung 1 zeigen, wann das erste Medikament in den Antibiotikaklassen in Deutschland oder einem anderem Land eingeführt wurde (ohne Berücksichtigung der Medikamente gegen Tuberkulose) [49].

### *Einsatz von Antibiotika*

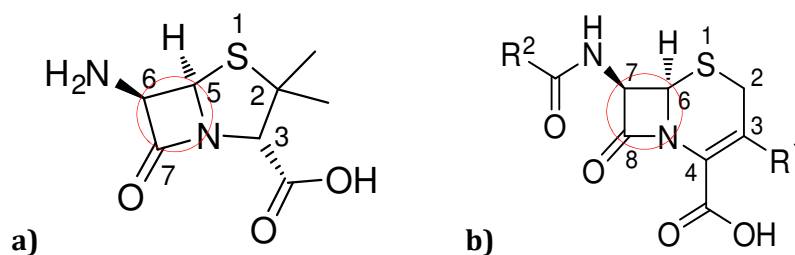
Antibiotika sind überlebenswichtige Arzneimittel zur Therapie von Infektionskrankheiten bei Mensch und Tier. Seit der Einführung von Penicillin in der 1940er Jahren sind antimikrobielle Mittel von wesentlicher Bedeutung für die Behandlung vieler mikrobieller Infektionen bei Mensch und Tier. Neben ihrem Einsatz zur Behandlung von Infektionskrankheiten (z. B. Lungenentzündung, Tuberkulose, Malaria, HIV/Aids) und Infektionen durch „Krankenhaushauskeime“ (z. B. MRSA, Methicillin resistenter *Staphylococcus aureus*) sind sie unverzichtbar für die Senkung des Risikos von Komplikationen bei komplexen medizinischen Eingriffen wie Hüftoperationen, Organtransplantationen, Chemotherapie und bei der Versorgung Frühgeborener. Zudem werden Antibiotika auch in der Veterinärmedizin und zu nicht-therapeutischen Zwecken eingesetzt (z. B. Desinfektionsmittel, Konservierungsmittel sowie Lebens- und Futtermittelzusätze) [50]. Der Einsatz von Arzneimitteln in der Tiermedizin kann verschieden erfolgen: Werden Antibiotika zur Vorbeugung angewendet, so spricht man von einem prophylaktischen Einsatz. Bei einem metaphylaktischen Einsatz sind einige Tiere in der Gruppe erkrankt, es wird aber die gesamte Gruppe behandelt, da davon ausgegangen wird, dass sich die noch gesunden Tiere anstecken werden bzw. bereits angesteckt haben

[51]. Ein prophylaktischer und metaphylaktischer Einsatz erfolgt in der Regel für die gesamte Tiergruppe, die Antibiotika werden dabei vorwiegend über das Futter oder das Wasser verabreicht. Die dritte Einsatzmöglichkeit ist der therapeutische Einsatz, hier erfolgt die Behandlung ausschließlich bei Erkrankung, demzufolge zumeist als Einzeltierbehandlung. Ferner können Antibiotika als Leistungsförderer bei der Mast wirken. Die Anwesenheit minimaler Antibiotikamengen verändert die Darmflora und führt zur verbesserten Futterverwertung [52]. In der EU ist der Einsatz von Leistungsförderern seit 2006 verboten [53]. Neben dem Einsatz in Human- und Veterinärmedizin werden z.B. Oxytetracyclin (OTC) oder Streptomycin auch gegen Feuerbrand in Obstplantagen angewendet. In den USA werden bis zu 0,5% des Gesamtantibiotikaverbrauchs an Pflanzen angewendet [54]. In der EU sind antibiotikahaltige Pflanzenschutzmittel nur in Ausnahmefällen erlaubt [55–57].

*Kurze Beschreibung ausgewählter Antibiotikaklassen:*

### 3.1.1 $\beta$ -Lactame

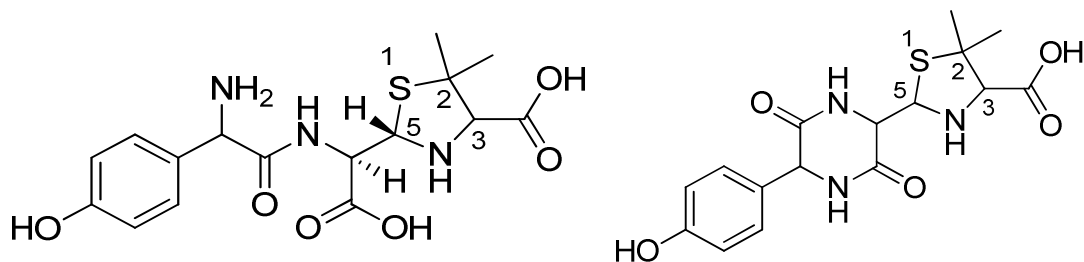
Das wohl bekannteste Antibiotikum Penicillin gehört zu den  $\beta$ -Lactamen. Penicilline werden von Schimmelpilzen der Gattung *Penicillium* gebildet.  $\beta$ -Lactame sind eine große Klasse von Antibiotika, zu denen neben den Penicillinen, die Peneme und Carbapeneme, die Cephalosporine und die Monolactame gehören. Zusammen verfügen sie über eine große therapeutische Breite. Allen gemeinsam ist der  $\beta$ -Lactamring (siehe Abbildung 2), der für die Funktion verantwortlich ist.



**Abbildung 2: Grundgerüst der a) Penicilline und b) Cephalosporine, der  $\beta$ -Lactamring ist rot eingekreist.**

Alle  $\beta$ -Lactame wirken bei der Zellwandbiosynthese auf die Penicillin-Binde-Proteine, die an der Peptidoglycansynthese beteiligt sind. Sie verhindern die Transpeptidation, die Quer-

vernetzung der Zellwandkomponenten, so dass die Zellwand ihre Stabilität verliert und anfällig gegenüber osmotischem Druck ist, was schließlich zur Zelllyse führt [36, 37, 41].  $\beta$ -Lactame werden nach Einnahme in großen Mengen wieder ausgeschieden, Amoxicillin (AMO) weist eine Ausscheidungsrate von 60-80% auf. Es werden die Muttersubstanz oder aktive sowie inaktive Metabolite ausgeschieden. Abbildung 3 zeigt die Penicilloinsäure von AMO (AMA) und 2,5-Diketopiperazin des AMO (Diketo) als inaktive Metabolite von AMO.



**a)** Natriumsalz der 4S)-2-[[[(2R)-2-Amino-2-(4-hydroxyphenyl)acetyl]amino]carboxymethyl]-5,5-dimethylthiazolidin-4-carbonsäure;

**Penicilloinsäure von AMO (AMA)**

**b)** (4S)-2-[5-(4-Hydroxyphenyl)-3,6-dioxopiperazin-2-yl]-5,5-dimethylthiazolidin-4-carbonsäure;

**2,5-Diketopiperazin von AMO (Diketo)**

**Abbildung 3: Hauptmetabolite von AMO: a) AMA und b) Diketo**

Ein Verbleib von AMO in der Umwelt ist kurzlebig, da es schnell zur Aufspaltung des  $\beta$ -Lactamringes und anschließend zur Mineralisierung durch Mikroorganismen kommt [58]. Um die Ökotoxizität von Antibiotika abzuschätzen, wird der Quotient aus zwei Konzentrationen gebildet. Die maximal gemessene Konzentration in der Umwelt (*MEC measured environmental concentration*) wird durch die Konzentration dividiert, bei der voraussichtlich noch keine nachteiligen Effekte auf Organismen in der Umwelt (*PNEC predicted no effect concentration*) bestehen. Bei  $MEC/PNEC > 1$  besteht ein Umweltrisiko, bei einem Quotienten kleiner eins ist keine Umweltschädigung zu erwarten. Es wird hier die aquatische Umwelt betrachtet. Das IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasser- Beratungs- und Entwicklungsgesellschaft mbH hat im Auftrag des Umweltbundesamt 479 Literaturquellen (bis 2010) hieraufhin ausgewertet. Es konnte ein MEC/PNEC-Verhältnis für Penicillin G, Ampicillin und AMO berechnet werden. Für die beiden ersten besteht kein Umweltrisiko, für AMO jedoch schon. Bei den Cephalosporinen konnte für Cefuroxim ein MEC/PNEC-Verhältnis von null errechnet werden, für Ceftiofur, Ceftbuten, Ceprozil sind keine MEC-Werte bekannt, die PNEC-Werte liegen zwischen 0,25 und 26  $\mu\text{g/L}$ . Allgemein müssen weitere Untersuchungen erfolgen,

insbesondere für die Cephalosporine, da hier für viele Antibiotika dieser Klasse steigende Verbrauchszahlen zu verzeichnen sind [59].

### 3.1.2 Chinolone

Chinolone sind eine synthetisch hergestellte Antibiotikaklasse mit einer großen therapeutischen Breite. Der Einsatz sollte der Therapie von „Problemkeimen“ vorbehalten bleiben und nicht zur Behandlung banaler Infektionen und nicht zur oralen Metaphylaxe in Beständen verwendet werden [37].

Die meisten Antibiotika dieser Klasse gehören zur Unterklasse der Fluorchinolone. Aufgrund ihrer Wirkung werden sie auch als Gyrasehemmer bezeichnet [37, 41]. Chinolone inhibieren die Typ II DNA Topoisomerase, diese besteht aus den Enzymen Gyrase und Topoisomerase IV. Beide Enzyme sind für die Replikation der DNA essentiell. Die DNA-Gyrase ermöglicht die Entwicklung der DNA in negative *supercoils*, diese Formation ist für die Replikation der DNA zwingend notwendig. Die Topoisomerase IV löst die beiden DNA-Stränge auseinander. Werden die Gyrase oder die Topoisomerase IV durch Komplexbildung mit Chinolonen gehemmt, so führt dies zum Stopp der Replikation und schließlich zum Zelltod. Die prokaryontische Topoisomerase ähnelt der eukaryontischen, somit können Chinolone auch auf Eukaryonten wirken [60, 61]. In Anwesenheit von Sauerstoff haben Fluorchinolone einen bakteriziden Effekt, der sich durch die Hemmung der beiden Topoisomerasen nicht erklären lässt. Es gibt demnach außerdem einen heute noch nicht bekannten Wirkungsmechanismus.

Fluorchinolone werden durch Licht in wenigen Tagen abgebaut. Diese Photokatalyse geschieht an der Oberfläche. Fluorchinolone, die an der Bodenmatrix sorbieren und sich z.B. in Nanoporen einlagern, sind unerreichbar für den Abbau. So kann es Jahre dauern, bis Fluorchinolone mineralisiert sind [62]. Cyanobakterien, Algen und Pflanzen zeigen höhere Sensitivität als Invertebraten und Fische [63]. Enrofloxacin (ENR), Ofloxacin und Norfloxacin werden vom IWW mit MEC/PNEC < 1, also ohne Umweltrisiko, bewertet, Ciprofloxacin stuften sie jedoch als umweltgefährdend ein.



### 3.1.3 Tetracycline

Tetracycline sind durch ihre vier Sechsringe (Naphthacen) gekennzeichnet und komplexieren stark mit Metallionen. Sie werden hauptsächlich von Streptomyceten gebildet. Chlortetracyclin (CTC) wurde Ende der 1940er-Jahre entdeckt. Tigecyclin wurde 2005 zuletzt eingeführt und gehört zur Untergruppe der Glycylcycline.

Tetracycline wirken bakteriostatisch, indem sie die Proteinsynthese an den Ribosomen inhibieren und die Anlagerung der tRNA verhindern [41, 64]. Es gibt mehrere Bindestellen für Tetracycline am Ribosom. Abhängig vom Tetracyclin und der Bindestelle ist die Affinität zur Bindung hoch oder niedrig. Diese Wirkung ist die klassische Tetracyclinwirkung, wie sie bei Tetracyclin (TC), Doxycyclin, Minocyclin, Tigecyclin, und Omadacyclin vorliegt. Daneben gibt es auch atypische Tetracycline wie Chelocardin und Anhydrotetracyclin. Sie wirken, indem sie die Cytoplasmamembran perturbieren [65]. Tetracycline sind Breitspektrumantibiotika mit wenigen Nebenwirkungen. Sie wirken gegen gram-positive und gram-negative Bakterien, sowie Chlamydien, Mycoplasmen, Rickettsien und Protozoen [64]. Tetracycline können auf Pflanzen letal wirken, auch Hefepilze werden durch CTC gehemmt. CTC hat keinen Effekt auf die biologische Aktivität des Bodens. Es kann aber zur Hemmung der Nitrifikation durch Tetracyclinderivate kommen [66].

Tetracycline sind schlecht in Wasser löslich. Die Ausscheidungsrate (Mensch, Tier) von CTC liegt bei 30%, für TC liegt sie bei 30-70%. Tetracycline werden wenig metabolisiert, somit gelangen große Teile der aktiven Muttersubstanz durch Ausscheidungen in die Umwelt. Tetracycline sind in der Umwelt langlebig [58] und haben PNEC-Werte im ng/L-Bereich, so dass für Tetracycline ein Umweltrisiko besteht [59].

## 3.2 Antibiotikaresistenz

Bakterien sind gegen Antibiotika resistent, wenn die Wirkung des Arzneimittels aufgehoben ist. Die Bakterien werden dann nicht mehr abgetötet bzw. an ihrem Wachstum gehindert. Es gibt verschiedene Grenzwerte, mit denen die Resistenz einer Bakterienspezies zu einem Antibiotikum beschrieben werden kann: Der epidemiologische Cut-off-Wert (ECOFF) ist die größte Antibiotikakonzentration bei der der Wildtyp weiterhin wächst. Beim Clinical Breakpoint ist die Antibiotikakonzentration gerade so hoch, dass der Therapieausgang noch erfolgreich ist. Hier kann somit eine Resistenz bereits vorliegen. Beide Grenzen (ECOFF und Breakpoint) werden vom europäischen Komitee für antimikrobielle Sensibilitätstests (EUCAST) festgelegt. Hierzu sammeln sie u.a. von den nationalen Komitees zahlreiche Werte der minimalen Hemmkonzentration für die Kombinationen Bakterienisolat und Antibiotikum [67, 68].

Das Vorhandensein von Antibiotikaresistenzgenen und ein in der Regel entsprechender Antibiotikaselektionsdruck sind Voraussetzungen für die Verbreitung und Entstehung von resistenten Bakterien. Hierbei darf das unerschöpfliche Reservoir von Antibiotikaresistenzgenen in Boden-Bakterien (Resistom) nicht übersehen werden. Z.B. gab es bereits Resistenzen gegen Tigecyclin bevor es therapeutisch eingesetzt wurde. Wright und Poinar (2012) fanden unter anderem Resistenzen gegen Vancomycin bei der Untersuchung von 30.000 Jahre alten Permafrost-Bohrkernen auf resistenzkodierende DNA [69]. Mikroorganismen sind in der Lage, sich außerordentlich schnell an veränderte Umweltbedingungen anzupassen: Eine wichtige Funktion zur Erhaltung des Gleichgewichtes im Ökosystem ist z.B. die Bildung von antibakteriell wirksamen Substanzen durch Mikroorganismen und die Entwicklung von Abwehrstrategien gegen diese Antibiotika. Resistenzen können entweder direkt vorliegen, so wird von primärer oder intrinsischer Resistenz gesprochen oder die Resistenz wird erst erworben, so liegt eine sekundäre Resistenz des Organismus vor.

- Primär oder natürlich resistent sind bestimmte Gattungen oder Spezies, wenn ein Antibiotikum bei ihnen eine Wirkungslücke besitzt. So sind Enterokokken natürlich unempfindlich gegen Cephalosporine und Ampicillin wirkt nicht bei *Pseudomonas aeruginosa*. Die primäre oder natürliche Resistenz findet man z.B. bei Pseudomonaden auch gegen die meisten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika.
- Die sekundäre Resistenz zeichnet sich durch den Verlust der Wirksamkeit eines Antibiotikums bei einem primär (natürlich) nicht resistenten Bakterium aus. Sie kann nach der Anwendung von Antibiotika bei zunächst sensiblen Bakterienarten auftreten. Die sekundäre Resistenz kann spontan durch Mutation oder durch Übertragung entstehen.

Resistenzen, die durch Genmutationen erworben wurden, werden vertikal an die folgenden Generationen vererbt. Wird die Resistenzeigenschaft unabhängig von der Fortpflanzung von einem zum nächsten Organismus übertragen, so findet ein horizontaler Gentransfer statt. Dieser kann auf unterschiedliche Weise erfolgen:

- Bei der Transduktion übertragen Bakteriophagen, das sind spezielle Viren, die resistenztragenden Gene zwischen den Bakterien.
- Bei der Transformation nehmen lebende Bakterien resistenzvermittelnde DNA aus der Umgebung, z.B. von toten Zellen stammend, auf und integrieren diese in das eigene Genom.
- Bei der Konjugation geben die Bakterien ihre Resistenzgene direkt an andere Mikroben weiter, indem sie schlauchförmige Fortsätze, sogenannte Pili ausbilden und damit am Nachbarorganismus andocken [70].

Die Genübertragung erfolgt bei den zwei letztgenannten häufig in Form von Plasmiden. Plasmide sind ringförmige DNA-Stränge, die leicht sowohl innerhalb derselben Bakterienspezies als auch zwischen verschiedenen Arten übertragbar sind. Plasmide können mehrere Gene enthalten, überdies kann das Bakterium Gene zwischen seinem Erbgut und den in der Zelle vorliegenden Plasmiden austauschen. Die neuen Eigenschaften von den erworbenen Genen können für das Wirtsbakterium zu einem Selektionsvorteil führen.

Die Antibiotikaresistenz wird durch verschiedene Mechanismen ausgeübt:

- Blockade der Aufnahme des Antibiotikums z.B. durch Veränderung in der Zusammensetzung der Zellmembran,
- Inaktivierung des Antibiotikums z.B. durch Spaltung des  $\beta$ -Lactamringes, der aktiven Struktur,
- Veränderung von Zielstrukturen in der Bakterienzelle, wie die Modifikation der Penicillinbindepoteine, so dass die  $\beta$ -Lactame nicht mehr binden können,
- Efflux des Antibiotikums durch aktiven Export des Hemmstoffes aus der Zelle [71].

### *Resistenzentwicklung bei Bakterien – Human- und Veterinärmedizin*

Betrachtet man die Resistenzentwicklung in der Humanmedizin genauer, so können bestimmte Erregergruppen erkannt werden, bei denen die Verbreitung der Resistenz besonders stark zu sein scheint. Hier sind vor allem die grampositiven Kokken (Staphylokokken, Enterokokken, Pneumokokken) zu nennen. MRSA-Stämme traten in den letzten Jahren zunehmend in den Brennpunkt. Sie sind in der Humanmedizin weltweit die am meisten gefürchteten Erreger nosokomialer Infektionen.

Zudem wird seit 2004 ein deutlicher Anstieg der Häufigkeit von Enterobacteriaceae (gram-negativ) mit ESBL beobachtet. ESBL sind  $\beta$ -Lactamasen. Diese können die molekulare Struktur, den  $\beta$ -Lactamring vieler verschiedener  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (z.B. Penicilline, Cephalosporine, Monobactame) spalten und das Antibiotikum damit unwirksam machen. ESBL können aufgrund von Aminosäureaustauschmutation(en) auch Cephalosporine der 3. und 4. Generation und Carbapeneme hydrolysieren. Sie haben somit ein erweitertes Substratspektrum (engl. „*extended spectrum*“) im Vergleich zu ihren Vorläufern - daher die Bezeichnung ESBL (*extended spectrum beta lactamases*) [72]. Einfache  $\beta$ -Lactamasen sind bei Bakterien evolutionär weit verbreitet, z.B. ampC bei Enterobacteriaceae oder als chromosomale Gene bei Bacteroides spp. und anderen Aerobiern, wie *Pseudomonas spp.* oder *Bacillus spp.* [73]. Die ersten *E. coli* mit  $\beta$ -Lactamasen wurden 1940 identifiziert. [74].

Die Anzahl der ESBL-Varianten steigt stetig. So können neun (evolutionäre) Familien (TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES und OXA) unterschieden werden. Die Gene für diese  $\beta$ -Lactamasen sind zumeist auf Plasmiden lokalisiert, was letztendlich die weite Verbreitung

dieser Enzyme ermöglicht. Die Plasmide besitzen einen breiten Wirtsbereich, d. h. sie können zwischen verschiedenen Arten der Enterobacteriaceae übertragen werden. Die mobilen Plasmide tragen häufig noch andere Resistenzgene und vermitteln somit Resistenzen gegen weitere Antibiotika. Sind dies Resistenzen gegen dieselbe Antibiotikaklasse, so wird von Ko-resistenz gesprochen. Bei einer Kreuzresistenz besitzt das Bakterium Resistenzen gegen verschiedene Antibiotikaklassen. Das Robert Koch Institut (RKI) führte zur Bestimmung der Häufigkeit und geografischen Verteilung von ESBL in Deutschland, in den Jahren 2004, 2008 und 2011 eine repräsentative Stichprobe von phänotypisch ESBL-positiven *E. coli*-Isolaten durch [75]. In den Proben wurden zu mehr als 90% CTX-M-Enzyme als Resistenzursache identifiziert. Die Variante CTX-M-15, welche Cephalosporine der 3. Generation besonders effektiv hydrolysieren kann, war besonders häufig (> 50% aller CTX-M-ESBL). Die zweithäufigste Variante war CTX-M-1 (>30% aller CTX-M-ESBL). Im RESET-Verbund wurden in Deutschland erste Ergebnisse von ESBL-Untersuchungen in verschiedenen Beständen (Schwein, Rind, Geflügel) veröffentlicht [76–79]. Danach wurden im Großteil der Schweine- bzw. Geflügelbestände ESBL-*E. coli* (darunter ein hoher Anteil CTX-M-ESBL) nachgewiesen. Die in *E. coli* beim Menschen häufigste Variante CTX-M-15 war beim Tier nur sehr selten nachweisbar. Insbesondere in Geflügelbeständen wurden neben ESBL auch Plasmid-vermittelte AmpC- $\beta$ -Lactamasen des Typs CMY (Anteil bis zu 20%) als Resistenzursache identifiziert [80]. Eine schwedische Studie konnte zeigen, dass die Besiedlung mit CMY-*E. coli* entlang der gesamten Produktionskette nachgewiesen und von den Elterntieren auf die Nachkommen weiter gegeben wird [81].

Die Rate an ESBL-produzierenden *E. coli* ist in den vergangenen Jahren stetig gestiegen und liegt derzeit bei fast 15% aller nachgewiesenen *E. coli*-Stämme bei Patienten auf Intensivstationen und ca. 7,5% bei ambulanten Patienten [80]. In der Normalbevölkerung wurden ESBL bei bis zu 7% der Probanden als intestinale Besiedler nachgewiesen. Die Aufnahme von ESBL-produzierenden *E. coli* erfolgt vorrangig über den fäkal-oralen Weg [82].

Bei den Nutztieren stellt sich die Resistenzsituation in Deutschland wie folgt dar (Tabelle 2):

**Tabelle 2: ESBL Besiedlung ausgewählter Tiere in Deutschland (83)**

<b>Tier</b>	<b>ESBL Besiedlung (<i>E. coli</i>)</b>
Huhn	73-89%
Schwein	85%
Kalb/ Rind	34%
Hund	14%
Ratte	16% (33% bei Ratten aus Abwassersystemen nahe Universitätskrankenhäusern)

ESBL-*E. coli* wird als Besiedler des Magen-Darmtraktes bei Vegetariern in gleicher Häufigkeit wie bei der Bevölkerung in Deutschland allgemein beobachtet [84]. Bei Untersuchungen in den Niederlanden wurden ESBL auch auf Gemüse nachgewiesen [85]. Auf die mögliche Verbreitung von ESBL-*E. coli* durch Vögel mit einem größeren Aktionsradius wie z.B. Saatkrähen, machen Lonacarić *et al.* (2013) aufmerksam [86]. Es gibt viele Möglichkeiten der Übertragung oder des Erwerbs von ESBL für den Menschen, so zeigten von Wintersdorff *et al.* (2014), dass 30% der Reiserückkehrer aus China und aus Süd-Ost-Asien, die vorher ESBL-negativ waren, nach der Reise ESBL-positiv sind. Es ist unklar, in welchem Ausmaß das Vorkommen von ESBL-Trägern beim Nutztier zur Verbreitung von ESBL-Trägern beim Menschen beiträgt. Darüber hinaus ist unbekannt, ob die Übertragung von Enterobacteriaceae mit ESBL zu einer vorübergehenden oder auch ständigen Besiedlung mit ESBL-produzierenden Enterobacteriaceae führt und welche Ursachen hierfür vorliegen [87].

Die jeweilige Tendenz in der Resistenzentwicklung scheint nicht ausschließlich von äußeren Faktoren, wie dem Selektionsdruck abzuhängen. Vielmehr spielt die Fähigkeit des Erregers, genetisches Material aufzunehmen und neu zu arrangieren eine wichtige Rolle [88].

Die Zunahme der Resistenzen unter den pathogenen Bakterien wird bzw. kann zu einem „postantibiotischen Zeitalter“ führen. Damit ist keine Panresistenz gegenüber allen verfügbaren Antibiotika gemeint, sondern eine eingeschränkte Therapieoption.

### *Bodenbakterien*

Die Arbeitsgruppe um Julian Davies (Universität of British Columbia, Kanada) formulierte 1973 erstmals das Konzept des Resistoms. Bakterien der Ordnung Actinomycetales (hauptsächlich Unterordnung Streptomycineae), von denen die meisten antimikrobiellen Wirkstoffe gewonnen wurden, müssen über Resistenzgene verfügen, um sich vor den selbst produzierten Stoffen zu schützen. Wenn pathogene Bakterien heute zunehmend resistent gegenüber Antibiotika sind, haben sie die Erbanlagen dafür womöglich von den nicht pathogenen Mikroben übernommen. Das Resistom bodenlebender Bakterien ist möglicherweise unerschöpflich. Genetische Untersuchungen mittels PCR zeigten, dass resistenzvermittelnde Erbanlagen in nahezu allen Bodenbakterien vorkommen und sich wahrscheinlich, durch menschliche Aktivität bedingt, stark anreichern [70]. Seit der Einführung der Antibiotika (Penicilline, 1942) haben die Resistenzen im Vergleich zur natürlichen Hintergrundbelastung stetig zugenommen. Das zeigen vergleichende Untersuchungen heutiger Böden mit archivierten Böden von 1940 aus den Niederlanden [89].

Aber nicht nur die Mikroorganismen des Erdreiches sind an der Verbreitung von Resistenzgenen beteiligt, sie werden stark unterstützt von den Mikroben des menschlichen oder tierischen Darms und den Bakterien aus Land- und Gewässerwirtschaft. Nach oraler Einnahme von Antibiotika kommen diese in Kontakt mit den Darmbakterien, bevor sie in den Organismus aufgenommen werden. Empfindliche Bakterien werden im Wachstum gehemmt, unempfindliche können sich stärker vermehren, das Gleichgewicht (Homöostase) verschiebt sich, die normale Darmflora kann die resistenten Erreger nicht mehr kontrollieren. Durch den Stuhl oder die Fäzes gelangen die resistenten Bakterien in die Kanalisation oder in die Gülle und später in die Umwelt [39]. Darmbakterien von Nutztieren können Resistenzgene mit denen der menschlichen Mikroflora austauschen. Antibiotikaresistente Bakterien von landwirtschaftlichen Nutztieren können bei der Düngung auf den Boden gelangen, wo die Möglichkeit besteht, dass die Resistenzgene an Bodenbakterien weiter gegeben werden. Die Nutztiere können wiederum durch das Erdreich mit den Bodenbakterien in Kontakt kommen, so dass diese ihre Erbanlagen an die Mikroflora der Tiere zurückgeben können [70]. Castro *et al.* (2014) kamen nach ihren Untersuchungen zum Schluss, dass Resistenzgene natürlicherweise im Boden vorkommen und dass diese mit Resistenzgenen von pathogenen Bakterien übereinstimmen können, dies aber nicht immer der Fall ist [90]. Die Arbeitsgruppe um Forsberg *et al.* (2012) konnte zeigen, dass multiresistente Bodenbakterien die gleichen Resistenzgene tragen wie human pathogene Bakterien. Die jeweiligen Genpaare stimmen in Ihren Nukleotidsequenzen überein. Hieraus schlossen die Autoren auf einen horizontalen Gentransfer und die Möglichkeit der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen [91]. Wang *et al.* (2014) untersuchten Böden, die mit Wasser aus Kläranlagen bewässert wurden, auf den Gehalt von Resistenzgenen und fanden eine Korrelation zwischen den Konzentrationen an Tetracyclinen im Wasser und dem Vorkommen von Tetracyclin-Resistenzgenen in Böden. Interessant war, dass eine positive Korrelation zu anderen Resistenzgenen, solche wie gegen Aminoglykoside, Chinolone, Sulfonamide und Chloramphenicol zu beobachten war [92]. Pietramellara *et al.* (2006) zeigten, dass die extrazelluläre DNA im Boden erhalten bleibt und durch die Kapillarkräfte im Boden wandern kann. Durch diese Wanderung kann die DNA von zeitlich und räumlich weiter entfernten Mikroorganismen aufgenommen werden (Transformation) und in deren genetische Information eingebaut werden [93]. Popowska *et al.* (2012) untersuchten landwirtschaftlich genutzte Böden und stellten diese einigen Waldböden und mit Kompost gedüngten Böden gegenüber. Aus der Tierhaltung war bekannt, dass die Tiere mit Erythromycin, OTC und/oder Streptomycin behandelt worden waren. Über die 16S rRNA wurden die Gattungen detektiert, zu denen die Bodenbakterien gehörten. Sie fanden Bakterien mit der höchsten MHK in Böden, die mit Gülle gedüngt wurden. Die Böden ohne Gülle zeigten mehr resistente Bakterien. Diese hatten aber

niedrigere MHK-Werte, sie trugen weniger Resistenzgene und keine Multiresistenzen [94]. Sengelov *et al.* (2003) stellten fest, dass je mehr tetracyclinhaltige Schweinegülle auf den Boden ausgebracht wurde, desto mehr resistente Bakterien gemessen werden konnten. Sie beobachteten außerdem, dass dieser Anstieg fünf Monate nach der Applikation wieder auf den Normalwert abgesunken war. Sie diskutierten in diesem Zusammenhang aber auch, dass die Bedingungen und die Zeit von fünf Monaten für den horizontalen Gentransfer ausreichen [95]. Andrew *et al.* (2004) konnten anhand des Transposons Tn916 zeigen, dass Resistenzgene zwischen den Bakterien übertragen werden können. Das Transposon Tn916 enthält Tetracyclin-Resistenzgene, die mithilfe des Transposons zwischen den Bakterien übertragen werden können. Die Arbeitsgruppe beimpfte sterilen und naturbelassenen Boden mit Tn916 tragenden Enterokokken. Im sterilen Boden wurde das Tn916 nur zusammen mit den Bakterien detektiert. Im Gegensatz dazu konnten die Autoren das Transposon im naturbelassenen Boden auch noch nachweisen, als die Enterokokken bereits abgestorben waren [96]. Aminov *et al.* (2001, 2002) sowie Chee-Sanford *et al.* (2001) stimmen bei ihren Untersuchungen darüber überein, dass Resistenzgene gegen Tetracycline durch die Landwirtschaft in die Umwelt und auch in das Grund- und Trinkwasser gelangen und sehen darin eine potentielle Gefahrenquelle für die Lebensmittel und damit für den Menschen am Ende der Nahrungsmittelkette [97–99].

### 3.3 Strategien, Studien und gesetzliche Regelungen

#### 3.3.1 Antibiotikaresistenzstrategie DART

Mit der 2008 veröffentlichten Deutschen Antibiotikaresistenzstrategie DART verfolgt die Bundesregierung ein gemeinsames Konzept (one Health Ansatz) zur Eindämmung der antimikrobiellen Resistenzen. Es wurden Ziele und Aktionen beschrieben, die Deutschland bei seinen nationalen und internationalen Bemühungen zur Antibiotikaresistenzbekämpfung umsetzen will (DART Zwischenbericht 2011, [100]). One Health (eine Gesundheit) bedeutet, dass Veterinär- und Humanmediziner und auch Umweltexperten zusammenarbeiten. Es ist ein integrativer Ansatz, ein nachhaltiges Gesundheitssystem zu gewährleisten. Denn die Gesundheit von Mensch und Tier, sowie die Intaktheit der Umwelt sind miteinander verbunden. So sind schätzungsweise 75% aller auftretenden Krankheiten Zoonosen. Beispiele hierfür sind HIV, Ebola, H5N1, H1N1, SARS [101]. Ein Datenaustausch zwischen den Ressorts menschliche Gesundheit, tierische Gesundheit, Umwelt, Lebensmittelsicherheit und Ernährungssicherung sowie Landwirtschaft ist nötig. Außerdem muss es eine verbesserte

Regierungs- und Unternehmensverantwortung und Investitionen in Forschung und Ausbildung und geben [102].

DART 2020 [103], veröffentlicht am 13.5.2015, verfolgt weiterhin folgende sechs Ziele:

- One-Health-Ansatz national und international stärken
- Resistenzentwicklungen frühzeitig erkennen
- Therapie-Optionen erhalten und verbessern
- Infektionsketten frühzeitig unterbrechen und Infektionen vermeiden
- Bewusstsein fördern und Kompetenzen stärken
- Forschung und Entwicklung unterstützen

Im veterinärmedizinischen Bereich soll im Rahmen der DART das Auftreten und die Verbreitung von Resistenzen bei human- und tierpathogenen Bakterien reduziert werden. Das gesamte Kontrollnetz umfasst für die Veterinärmedizin folgende Maßnahmen, die zum Teil bereits umgesetzt sind:

- Verschreibungspflicht aller Antibiotika in der Tiermedizin
- Leitlinien für Tierärzte zum verantwortungsvollen Umgang mit Antibiotika zur sachgerechten Behandlung der Tiere.
- Beschränkung der Zulassung von Antibiotika grundsätzlich auf metaphylaktische und therapeutische Behandlung.
- Einschränkung der Therapiefreiheit, z.B. bei der Anwendung von besonders wichtigen Antibiotika aus der Humanmedizin.
- Antibiotikaverkaufsmengenerfassung nach DIMDI-AMV
- Dokumentation der Abgabe von Antibiotika durch Tierärzte
- Dokumentation der Anwendung von Antibiotika bei Nutztieren
- Bestimmung der Therapiehäufigkeit mit Antibiotika und Maßnahmen bei übermäßigem Gebrauch (Antibiotikaminimierungskonzept)
- Leitfaden zur oralen Medikation von Nutztieren
- Kontrollpläne zu Rückständen in Lebensmitteln
- öffentliches und privatwirtschaftliches Monitoring der Resistenzentwicklung bei Krankheitserregern
- Erfassung produktspezifischer Daten zur Zulassung auf dem Markt befindlicher Antibiotika
- keine Verwendung von Antibiotika als Leistungsförderer [103]

Tabelle 3 zeigt die aktuellen deutschen Gesetzte und Verordnungen zum Umgang mit Arzneimitteln in Veterinärmedizin und Landwirtschaft.



**Tabelle 3: Gesetzliche Regelungen zu Arzneimitteln in der Veterinärmedizin**

<b>Überblick über die nationalen gesetzlichen Regelungen, die Tierärzte und Tierhalter beim Umgang mit Arzneimitteln zu beachten haben [104]:</b>
Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz – AMG)
Erwerb und Besitz durch Tierhalter; Nachweise (§ 57), Anwendung durch Tierhalter (§ 57a), Anwendung bei Tieren, die der Gewinnung von Lebensmitteln dienen (§ 58)
Tierärztliche Hausapothekenverordnung (TÄHAV)
Verordnung über verschreibungspflichtige Arzneimittel (Arzneimittel-Verschreibungspflicht-Verordnung – AMVV)
Verordnung über apothekenpflichtige und freiverkäufliche Arzneimittel (AMVerkRV)
Verordnung über Standardzulassungen von Arzneimitteln (StandZV)
Arzneimittelpreisverordnung (AMPreisV)
Verordnung über Nachweispflichten der Tierhalter für Arzneimittel, die zur Anwendung bei Tieren bestimmt sind (Tierhalter-Arzneimittel-Nachweisverordnung – ANTHV)
Gesetz über den Verkehr mit Betäubungsmitteln (Betäubungsmittelgesetz – BtMG) mit Folgeverordnungen
Verordnung über das Verschreiben, die Abgabe und den Nachweis des Verbleibs von Betäubungsmitteln (Betäubungsmittel-Verschreibungsverordnung – BtMVV)
Betäubungsmittel-Binnenhandelsverordnung (BtMBinHV) und Außenhandelsverordnungen (BtMAHV) mit Bekanntmachungen
Tiergesundheitsgesetz (TierGesG)
Verordnung über Sera, Impfstoffe und Antigene nach dem Tierseuchengesetz (Tierimpfstoff-Verordnung – TierImpfStV)
Vertriebsweg, Nachweispflicht (§ 40), Anwendung durch den Tierhalter (§ 44), Vorrathaltung von Mitteln (§ 45)
Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung (PharmStV)
Tierschutzgesetz (TierSchG)

### 3.3.2 Tierarzneimittel-Abgabemengenregister der Veterinärmedizin nach der DIMDI-Arzneimittelverordnung

Seit 2011 werden die Abgabemengen von Antibiotika durch pharmazeutische Unternehmer und Großhändler an Tierärzte gemäß § 47 Absatz 1c des Arzneimittelgesetzes in Verbindung mit der DIMDI-Arzneimittel-Verordnung erfasst [105]. Die vierte Auswertung der Daten aus dem Tierarzneimittelabgaberegister (TAR) nach DIMDI (Deutschen Instituts für Medizinische Dokumentation und Information) zu den Antibiotikaabgabemengen in Deutschland ist am 28.07.2015 erschienen und zeigt einen kontinuierlichen Rückgang der gesamten Abgabemenge von 1706 t in 2011 auf 1238 t in 2014 (siehe Tabelle 4). Wahrscheinlich ist diese Reduktion durch den Anstieg von Wirkstoffen mit geringer Dosierung pro kg Körpergewicht (KG) begründet. Tetracycline sind in einer Dosierung bis zu 40 mg/kg KG zugelassen und Fluorchinolone mit 2,5 bis 10 mg/kg KG und Cephalosporine der 3. Generation können mit 1 bis 2 mg/kg KG dosiert werden. Bei den Tetracyclinen ist ein Abfall um 222 t (39%) zu verzeichnen, bei den Fluorchinolonen dagegen ein Anstieg um 4 t (50%). Letzterer

Anstieg ist als besonders kritisch zu sehen, da die Fluorchinolone zu der Gruppe der Reserveantibiotika gehören.

Die am meisten abgegebenen Arzneimittel waren mit 93% zur oralen Anwendung bestimmt. Wallmann *et al.* (2014) weist darauf hin, dass keine direkte Verbindung zwischen den ermittelten Abgabemengen, dem Einsatz bei den verschiedenen Tiergruppen (Lebensmittel-liefernd versus Haustier) oder einer Behandlungshäufigkeit einzelner Tierarten herzustellen ist, auch sind die Angaben zur regionalen Abgabemengenerfassung nur bedingt auswertbar. Dies führt zur Schlussfolgerung, dass eine direkte Verknüpfung der DIMDI-Daten mit der Resistenzentwicklung nicht sachgerecht ist [106].

**Tabelle 4: Abgabemenge antimikrobiell wirksamer Grundsubstanz ausgewählter Wirkstoffklassen [t] 2011 bis 2014 [107]**

	Abgegebene Menge von Antibiotika durch pharmazeutische Unternehmer und Großhändler an Tierärzte in t			
	2011	2012	2013	2014
<b>Penicilline</b>	<b>528</b>	<b>501</b>	<b>473</b>	<b>450</b>
<b>Tetracycline</b>	<b>564</b>	<b>566</b>	<b>454</b>	<b>342</b>
Sulfonamide	185	162	152	121
Makrolide	173	145	126	109
Polypeptid-Antibiotika	127	124	125	107
Aminoglykoside	47	40	39	38
Folsäureantagonisten	30	26	24	19
Pleuromutiline	14	18	15	13
<b>Fluorchinolone</b>	<b>8,2</b>	<b>10,4</b>	<b>12,1</b>	<b>12,3</b>
Phenicol	6,1	5,7	5,2	5,3
<b>Cephalosporine 3. Gen.</b>	<b>2,1</b>	<b>2,5</b>	<b>2,3</b>	<b>2,3</b>
Cephalosporine 1. Gen.	2	2	2	2,1
Cephalosporine 4. Gen.	1,5	1,5	1,5	1,4
<b>Gesamt</b>	<b>1706</b>	<b>1619</b>	<b>1452</b>	<b>1238</b>

### 3.3.3 Studie zum Antibiotikaverbrauch in niedersächsischen Mastbetrieben

Das niedersächsische Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft, Verbraucherschutz und Landesentwicklung hat eine landesweite Erhebung zum Arzneimitelesatz in der Nutztierhaltung in Auftrag gegeben. In 206 Mastbetrieben (Huhn, Pute, Schwein, Rind) wurden die Arzneimittelabgabe- und Anwendungsbelege von 2009/2010 bzw. 2010 ausgewertet. In mehr als Dreiviertel der Betriebe wurden Antibiotika eingesetzt. Die Betriebe setzten jedoch nicht in jedem Mastdurchgang Antibiotika ein, denn der Anteil der Durchgänge, deren Tiere mit Antibiotika behandelt wurden, war kleiner als der Anteil der Betriebe, die Antibiotika einsetzten.

Bei den Puten kamen die reinen Mastbetriebe in 29% der Durchgänge ohne Antibiotikaeinsatz aus, die Putenbetriebe mit Aufzucht mussten in 92% der Mastdurchgänge Antibiotika

einsetzen. In der Rindermast konnten bei den Fressern (Bullenkälber) in 22% der Durchgänge auf Antibiotika verzichtet werden. Bei den Mastkälberbetrieben wurden in allen Durchgängen Antibiotika verabreicht. Aufgeteilt nach den Antibiotikaklassen wurden bei den Mastschweinen in 21% der Antibiotikaeinsätze  $\beta$ -Lactame verwendet, zu 17% Tetracycline, 16% Makrolide und zu 6% Sulfonamide. Fluorchinolone wurden zu 7% und Cephalosporine zu 1% eingesetzt [108].

### 3.3.4 Studie zum Antibiotikaeinsatz in Masthähnchenbetrieben in Nordrhein-Westfalen

Das Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen gab 2011 eine Studie zum Antibiotikaverbrauch in der nordrheinwestfälischen Hähnchenmast heraus. Es wurden 182 Betriebe über einen Zeitraum von 4 Monaten untersucht. Die Tierbestände waren zwischen 3.400 und 170.000 Tiere groß. In 18 dieser Betriebe wurden in keinem Mastdurchgang Antibiotika eingesetzt. Weitere Betriebe konnten in einigen ihrer Mastdurchgänge auf Antibiotika verzichten, so dass es bei knapp 20% aller Mastdurchgänge keine medizinische Notwendigkeit des Einsatzes von Antibiotika gab. In der Studie wird darauf hingewiesen, dass mehr als die Hälfte der antibiotikafreien Mastdurchgänge zu Betrieben mit weniger als 10.000 Tieren gehörten. Auch wird beschrieben, dass der Antibiotikaeinsatz mit der Betriebsgröße zunahm, außer bei sehr großen Betrieben (über 90.000 Tiere), hier fiel der Einsatz wieder, blieb aber über dem Durchschnitt. Ferner lag bei 53% der Antibiotikagaben die Behandlungsdauer mit 1-2 Tagen deutlich unter den Zulassungsbedingungen. Aus der Studie kann gefolgert werden, dass in der Hähnchenmast ein erheblicher Einsatz von Antibiotika stattfindet und es fraglich ist, ob dieser stets nach den Antibiotikaleitlinien eines verantwortungsvollen Umgangs mit antimikrobiellen Wirkstoffen erfolgt [109, 110].

### 3.3.5 Forschungsprojekt VetCAB (Veterinary Consumption of Antibiotics)

Unter dem Namen VetCAB (Veterinary Consumption of Antibiotics) führten bzw. führen das Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung der Stiftung tierärztliche Hochschule Hannover und das Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig Studien zum Antibiotikaverbrauch in der Nutztierhaltung durch [111]. Im Jahr 2007/2008 wurde eine sogenannte Machbarkeitsstudie durchgeführt, indem von ausgewählten Tierarztpraxen aus Niedersachsen bzw. Betrieben aus Nordrhein-Westfalen die Arzneimittelanwendungs- und Abgabebeläge vom 1. September 2006 bis 31. August 2007 ausgewertet wurden. Sie berechneten für

Mastschweine 29 Tagesdosen pro Tier und Jahr und für Milchkühe 3 Tagesdosen pro Tier und Jahr [112]. In der nachfolgenden, für 2011 durchgeführten Studie VetCAB-Pilot teilten sie Deutschland anhand seiner landwirtschaftlichen Struktur in 4 Gebiete auf und untersuchten aus jedem Gebiet Betriebe, so dass die Ergebnisse von VetCAB-Pilot repräsentativ für Deutschland sind. Mit insgesamt 1260 untersuchten Betrieben aus 89 Landkreisen wurden bis zu 4% der in Deutschland gehaltenen Nutztiere erfasst. Der Erhebungszeitraum war von Juni 2011 bis März 2012. Neben der Menge des eingesetzten Arzneimittels wurden die Dosierung, die Darreichungsform, die Diagnose sowie die Tierart und die Region erhoben, ergänzend wurde die Therapiehäufigkeit berechnet [113]. Die Therapiehäufigkeit sagt aus, an wie vielen Tagen ein Tier in einem Bestand im Durchschnitt mit einem Wirkstoff behandelt wurde [114]. Die Therapiehäufigkeit wurde für einen Zeitraum von 100 Tagen und hier auch für ein Jahr berechnet bzw. hochgerechnet, falls die Mastdauer kürzer ist. Für den Zeitraum von 100 Tagen ergibt sich für ein Masthähnchen eines Betriebes eine Therapiehäufigkeit von 25,8 Tagen (94/Jahr), für das Mastschwein eine Therapiehäufigkeit von 3,7 Tagen (14/Jahr), für Kälber 0,3 Tage (1/Jahr) und für die Milchkuh 1 Tag (4/Jahr) Behandlung mit einem Wirkstoff in dieser Zeitspanne. Je nach Nutztierart werden unterschiedliche Antibiotikaklassen vermehrt eingesetzt. So überwiegen mit 45% Mengenanteil die  $\beta$ -Lactame bei den Rindern, gefolgt von den Tetracyclinen mit 19% und den Sulfonamiden/Trimethoprim mit 16%. Werden Einzelgaben gezählt, so verringert sich der Anteil der  $\beta$ -Lactame auf 36%, sie bleiben aber an erster Stelle, wieder gefolgt von den Tetracyclinen mit 14% und den Cephalosporinen mit 13% aller Einzelgaben. Bei den Schweinen werden am häufigsten Tetracycline (36%), aber auch  $\beta$ -Lactame (33%) verbraucht. Bezogen auf Einzelgaben werden zu 28%  $\beta$ -Lactame, 24% Polypeptide und zu 21% Tetracycline angewendet [113]. Die VetCAB-Pilot-Studie wird als VetCAB-Sentinel weitergeführt, um den Antibiotikaeinsatz zu überwachen und gegebenenfalls Änderungen über die Zeit festzustellen [115].

### 3.3.6 Privatwirtschaftliche Initiative QS (Qualität und Sicherheit)

QS wurde von der Agrar- und Ernährungswirtschaft 2001 gegründet und soll zu mehr Qualität und Sicherheit in Lebensmitteln führen. Insgesamt nehmen 79.000 Tierhalter am QS-System teil, so dass 95% des deutschen Schweine- und Geflügelfleisches sowie 70% des Rindfleisches aus QS-zertifizierten Betrieben stammen. Ziel von QS ist eine umfangreiche Herkunftssicherung. So führt QS z.B. Monitoringprogramme zu Schadstoffen in Futtermitteln, Vorkommen von Salmonellen im Fleisch und Masttier und zum Antibiotikaeinsatz in

den Betrieben durch. Für das Antibiotikamonitoring wird ein Therapieindex pro Betrieb wie folgt berechnet:

**Gl. 1**

$$\text{Therapieindex} = \frac{\Sigma(\text{Behandlungstage} \cdot \text{Anzahl Wirkstoffe} \cdot \text{Anzahl behandelter Tiere})}{\text{Tierzahl im Bestand}}$$

QS erfasst die Antibiotikaverbräuche seit 1. April 2012 in Mastgeflügel haltenden Betrieben und seit September 2012 in den Schweinemastbetrieben, sowie seit 2014 die der ferkelproduzierenden Betriebe und der Kälbermastbetriebe. Im zweiten Halbjahr 2014 hatten 26% der Schweinemastbetriebe einen Therapieindex von 0 und 21% einen Therapieindex von 1. Somit setzten 47% der Schweinemastbetriebe kaum Antibiotika ein. Bei einem der Betriebe wurde jedoch ein extrem hoher Therapieindex von über 50 berechnet. Durchschnittlich wurde für alle Schweinemastbetriebe ein Therapieindex von 6,68 ermittelt. Tabelle 5 auf Seite 38 zeigt den Median und das dritte Quartil der QS-Betriebe im Vergleich zur Therapiehäufigkeit, die nach dem Arzneimittelgesetz berechnet wird. Die Kennzahlen sind jeweils für verschiedene Tiergruppen angeben [116–121].

### 3.3.7 16. Novelle des Arzneimittelgesetzes, HIT-Datenbank

Am 1. April 2014 trat die 16. Novelle des Arzneimittelgesetzes (AMG) in Kraft. Es soll zu weniger Einsatz von Antibiotika führen, indem die Transparenz in der Tierhaltung erhöht wird. Zur Erfassung des Antibiotikaeinsatzes und zum anschließenden Benchmarking wird die HIT-Datenbank (Herkunfts- und Informationssystem für Tiere) genutzt. Tierhalter, die vermehrt zu viele/zufu oft Antibiotika einsetzen, müssen mit Sanktionen, im Extremfall mit Haltungsverbot, rechnen [122]. Im März 2015 wurde die erste Auswertung vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) veröffentlicht. Ähnlich wie bei QS wird die Anzahl der antibiotischen Behandlungen in Beziehung zum Gesamtbestand gesetzt:

**Gl. 2**

$$\text{Therapiehäufigkeit} = \frac{\Sigma[(\text{Anzahl behandelter Tiere}) \times (\text{Anzahl Behandlungstage})]}{\text{Durchschnittliche Anzahl gehaltener Tiere pro Halbjahr}}$$

**Gl. 3**

durchschnittl.

$$\text{gehaltene Anzahl Tiere} = \frac{\Sigma[(\text{Anzahl Tage des Zeitraumes}) \times (\text{Anzahl Tiere des Zeitraumes})]}{\text{Anzahl Tage des Zeitraumes}}$$

Die Meldung der Antibiotikaeinsätze kann mit dem QS-Monitoring erfolgen und/oder der Tierhalter beauftragt den Tierarzt, die Meldungen abzugeben. Die Meldung des Antibiotikaeinsatzes an die HIT-Datenbank ist im Gegensatz zu QS ab einer bestimmten Betriebsgröße verpflichtend. Gemäß der Verordnung über die Durchführung von Mitteilungen nach §§ 58a und 58b des Arzneimittelgesetzes (TAMMitDurchfV) fallen Betriebe unter die Meldepflicht, die im Durchschnitt eines Kalenderhalbjahres mehr als

- 20 Mastkälber (ab dem Absetzen vom Muttertier bis 8 Monate),
- 20 Mastrinder (über 8 Monate),
- 250 Mastferkel (ab dem Absetzen vom Muttertier bis 30 kg),
- 250 Mastschweine (über 30 kg),
- Mastputen (ab dem Schlupf),
- 10.000 Masthähnchen (ab dem Schlupf) haben.

Die Therapiehäufigkeit wird pro Betrieb für das jeweilige Halbjahr berechnet. Der Median (Kennzahl I) und das dritte Quartil (Kennzahl II) über alle Therapiehäufigkeiten wird bestimmt. Diese Kennzahlen dienen dem eigentlichen Monitoring. Alle Betriebe für die eine Therapiehäufigkeit über der Kennzahl II berechnet wurde, müssen einen schriftlichen Antibiotikaminimierungsplan mit ihrem Tierarzt ausarbeiten und der Behörde vorlegen. Betriebe, die eine Therapiehäufigkeit zwischen Kennzahl I und II aufweisen, müssen den erhöhten Antibiotikaeinsatz begründen.

**Tabelle 5: Übersicht der Kennzahlen I und II im QS-Antibiotikamonitoring und der staatlichen Datenbank HIT [111]**

Produktionsart	Kennzahl I		Kennzahl II	
	Median QS	Median BVL/HIT	Drittes Quartil QS	Drittes Quartil BVL/HIT
Aufzuchtferkel (bis 30 kg)	12,3	4,8	33,0	26,2
Mastschweine (ab 30 kg)	2,1	1,2	8,9	9,5
Masthühner	4,5	19,6	6,9	35,0
Mastputen *	17,9	23,0	27,9	47,5
Jungputen *	11,2		16,3	
Mastkälber (bis 8 Monate)	28,9 **	0,0	40,6 **	5,1

\* Bei QS wird Putenmast und Putenaufzucht getrennt berechnet.

\*\* Bei QS nur spezialisierte Kälbermast

### 3.3.8 Antibiotikaverbrauch und Verbreitung von Resistenzen, GERMAP

Der Antibiotikaresistenzatlas GERMAP gibt einen Überblick über die Resistenzsituation in Human- und Veterinärmedizin und über die Verbrauchsmengen von Antibiotika in beiden Sektoren. Der veterinärmedizinische Teil beruht im Wesentlichen auf den Daten des GERM-

Vet-Monitoringprogramms [123]. Der Bericht wird vom BVL, der Paul Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. und der Infektiologie Freiburg unter Beteiligung vieler anderer Institutionen herausgegeben. Bisher sind drei Berichte, GERMAP 2008, GERMAP 2010 und GERMAP 2012 veröffentlicht.

Der Bericht GERMAP 2012 [124] belegt, dass in der Humanmedizin der Anteil der Breitbandantibiotika am Gesamtverbrauch – mit den Cephalosporinen und Fluorchinolonen an der Spitze – nach wie vor sehr hoch ist, sogar weiter zugenommen hat. Dies gilt sowohl für den ambulanten, als auch für den stationären Versorgungsbereich. Das Gesamtverordnungsvolumen und die Verordnungsdichte nahmen in den letzten Jahren jedoch ab. Die Resistenzsituation ist je nach Bakterium, Antibiotikum und Art der Patienten anders. Dies gilt für Human- und Tierpathogene gleichermaßen. So liegt die Makrolid-Resistenz bei Pneumokokken bei ca. 10%. Die Penicillinresistenzrate ist 3,4% bei Kindern und 0,4% bei Erwachsenen. Bei den Salmonellen sind die Typhimurium-Stämme meist mehrfachresistent, die Enteritidis-Stämme jedoch zu 95% sensibel gegen die getesteten Antibiotika. Weiterhin führt der Bericht auf, dass Carbapenemresistenzen noch selten sind, aber aufgrund des erhöhten Carbapenemverbrauchs ein Anstieg erwartet wird. Neben der Darstellung der Resistenzdaten und des Antibiotikaverbrauchs wird in sogenannten GERMAP-*spezial*-Artikeln auf die aktuellen Themen näher eingegangen, z.B. wird die ESBL-Situation bei *E. coli* in Tieren beschrieben. So konnten in der GERM-Vet-Studie 2% der Bakterienisolate als ESBL-Bildner identifiziert werden. Im Fazit wird darauf hingewiesen, dass die ESBL-Gene meist auf Plasmiden lokalisiert sind, die auch weitere Resistenzen tragen können, so dass auch Nicht- $\beta$ -Lactamantibiotika einen Selektionsdruck hervorrufen können. Außerdem begünstigt die plasmidäre Lage einen horizontalen Gentransfer. Im RESET-Programm werden detaillierte Studien zu Vorkommen und Ausbreitung von ESBL- und Carbapenemase-positiven Enterobacteriaceae durchgeführt, so dass ein wechselseitiger Austausch entsprechender Gene zwischen verschiedenen Bakterien überprüft werden kann [124].

### 3.3.9 Resistenzen in der Veterinärmedizin, GERM-Vet

Das nationale Resistenzmonitoring tierpathogener Erreger (GERM-Vet) wird auf Grundlage von § 77 Abs. 3 AMG vom BVL seit 2001 durchgeführt. Durch die Erhebung valider Empfindlichkeitsdaten kann die aktuelle Resistenzsituation beurteilt werden. Es gehen ausschließlich Resistenzdaten von Isolaten erkrankter Tiere in die Erhebungen ein [125]. Nach einem festgelegten Stichprobenplan werden Bakterien durch 40 nationale Laboratorien gesammelt und am BVL auf ihre Empfindlichkeit gegenüber 24 Antibiotika überprüft [126].



Zum nationalen Resistenzmonitoring für Tierpathogene gehören folgende Aufgaben:

- Monitoring der Resistenz bei Zoonoseerregern,
- Monitoring der Resistenz bei Kommensalen,
- Nationaler Rückstandskontrollplan (NRKP),
- Postmarketing-Datensammlung
- Abgabemengenerfassung (TAR).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Resistenzsituation bislang noch günstig ist, so treten bei den Erregern für Euterentzündung nur vereinzelt ESBL und MRSA auf, allgemein liegt eine geringe Resistenz vor. Auch die Erreger von Atemwegserkrankungen zeigen gute Empfindlichkeiten. Ferner sind bei *Enterococcus spp.* keine Vancomycin-Resistenzen zu detektieren. Jedoch liegt eine Resistenzrate von über 70% bei Durchfallerkrankungen und zudem eine hohe ESBL-Rate bei *E. coli* vor [127].

### 3.3.10 Antibiotikaresistenzen in der Lebensmittelkette, DARLink

Das BfR hat 2010 einen Bericht zur Deutschen Antibiotikaresistenzsituation in der Lebensmittelkette (DARLink) herausgegeben, der die Resistenzdaten von 33.625 Salmonella-Isolaten von Tieren, Lebensmitteln, Futtermitteln und aus der Umwelt im Zeitraum von 2000-2008 retrospektiv zusammenfasst. Von diesen 33.625 Isolaten zeigten 48% eine Resistenz nach Definition der WHO und des Codex Alimentarius gegenüber mindestens einer und 35% der Isolate Resistenzen gegen mehrere Antibiotikaklassen [128]. Weitere Untersuchungen aus dem Jahr 2009 bestätigen die Ergebnisse. Für *Campylobacter* und *E. coli* werden ähnliche Ergebnisse erzielt [129]. Die erhobenen Resistenzdaten von Zoonoseerregern und Kommensalen werden in jährlichen Berichten an die EFSA (Europäische Agentur für Lebensmittelsicherheit) übermittelt und vom BfR veröffentlicht.

Das Monitoring wurde ab dem Jahr 2009 risikoorientiert auf Zoonoseerreger, wie *Campylobacter* und auf Kommensalen, wie z. B. *E. coli*, ausgedehnt. Hierbei wurden sowohl lebende Tiere als auch Lebensmittel tierischer Herkunft vom nationalen Referenzlabor für Antibiotikaresistenz am BfR auf Resistenzen gegen Antibiotika untersucht. Resistente Bakterien konnten bei allen untersuchten Herkünften (Schwein, Huhn, Pute, Rind) detektiert werden. Die Isolate aus dem Fleisch von Mastgeflügel wiesen dabei eine deutlich stärker ausgeprägte Resistenz gegen Fluorchinolone und Cephalosporine auf als die Isolate der anderen Herkünfte [128–130].



### 3.3.11 Antibiotikaverbrauch und Maßnahmen in EU-Ländern, ESVAC

Auf europäischer Ebene protokolliert die europäische Arzneimittelagentur im ESVAC-Report (*European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption*) den Antibiotikaverbrauch in der Veterinärmedizin von mittlerweile 26 Ländern. Begonnen wurde 2009 mit einem Rückblick, einer Trendbeschreibung von 9 Ländern, 2010 folgte die erste Datenerhebung mit 19 Ländern, gefolgt von 25 Ländern in 2011. Die EU weist darauf hin, dass die Daten vorsichtig zu interpretieren sind, da es einige Jahre dauert, bis die Datenerfassungen valide Zahlen liefern.

Viele Länder führen ein Antibiotikamonitoring durch. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Programme: Die skandinavischen Länder waren die Ersten, die den Antibiotikaverbrauch in der Tierhaltung erfassten. Seit 2011 werden „Antibiotika-Hochverbraucher“ in Dänemark gemahnt und vermehrt durch die Behörde kontrolliert, wenn sie diesen nicht reduzieren. Die Niederlande setzten das Ziel, den Antibiotikaverbrauch in 2015 im Vergleich zu 2009 um 70% zu reduzieren [131].

**Tabelle 6: Monitoringprogramme bzw. Berichte über den Antibiotikaverbrauch in der Veterinärmedizin europäischer Länder [131]**

Land	Programm /Bericht	Link	Datenerhebung ab:
Österreich	Antibiotikaresistenz und Verbrauch antimikrobieller Substanzen in Österreich— AURES	<a href="http://www.ages.at/themen/arzneimittel/aures-berichte">http://www.ages.at/themen/arzneimittel/aures-berichte</a>	2004
Tschechien	Spotřeba antimikrobik a antiparazitik ve veterinární medicíně v letech	<a href="http://www.uskvbl.cz/cs/informace/tiskove-centrum/tiskprohl">http://www.uskvbl.cz/cs/informace/tiskove-centrum/tiskprohl</a>	2005
Belgien	belgische Überwachung des Verbrauchs an Veterinärantibiotika – BelVet-SAC	<a href="http://www.fagg-afmps.be/fr/binaries/belvetsac%20rapport%202012%20finaal_tcm291-226527.pdf">http://www.fagg-afmps.be/fr/binaries/belvetsac%20rapport%202012%20finaal_tcm291-226527.pdf</a>	2009
Zypern	Verkauf von veterinär antimikrobiellen Produkten in Zypern	<a href="http://www.moa.gov.cy/moa/vs/vs.nsf/vs74_gr/vs74_gr?OpenDocument">http://www.moa.gov.cy/moa/vs/vs.nsf/vs74_gr/vs74_gr?OpenDocument</a>	2011
Dänemark	Programm für die Überwachung des Verbrauchs von antimikrobiellen Substanzen und Resistenz in Bakterien von Tieren, Lebensmittel und Menschen – DANMAP	<a href="http://www.danmap.org">http://www.danmap.org</a>	1996
Finnland	Monitoring antimikrobieller Resistenzen und Verbrauch von antimikrobiellen Substanzen in der Veterinärmedizin– FINRES-Vet	<a href="http://www.evira.fi/portal/en/evira/publications?a=category&amp;cid=28">http://www.evira.fi/portal/en/evira/publications?a=category&amp;cid=28</a>	2005
Frankreich	Verkaufszahlerhebung von veterinärmedizinischen Produkten mit antimikrobiellen Substanzen	<a href="http://www.anses.fr/sites/default/files/documents/ANMV-Ra-Antibiotiques_2012EN.pdf">http://www.anses.fr/sites/default/files/documents/ANMV-Ra-Antibiotiques_2012EN.pdf</a>	1999
Deutschland	Abgabemengenerfassung antimikrobiell wirksamer Stoffe in Deutschland – DIMDI-AMV	<a href="http://www.bundestieraerztekammer.de/index_dtbl_presse_details_gs.php?X=20140225154109">http://www.bundestieraerztekammer.de/index_dtbl_presse_details_gs.php?X=20140225154109</a>	2011
Island	Sýklalyfjanotkun og sýklalyfjanæmi baktería í mönnum og dýrum á Íslandi 2012	<a href="http://www.landlaeknir.is/servlet/file/store93/item20502/Notkun%20og%20n%C3%A6mi%20Skysla%202012-loka.juni2013.pdf">http://www.landlaeknir.is/servlet/file/store93/item20502/Notkun%20og%20n%C3%A6mi%20Skysla%202012-loka.juni2013.pdf</a>	2010
Irland	Verbrauchserhebung von Veterinärantibiotika	<a href="http://www.hpra.ie/docs/default-source/default-document-library/report-on-consumption-of-veterinary-antibiotics-in-irelandduring-2012.pdf">http://www.hpra.ie/docs/default-source/default-document-library/report-on-consumption-of-veterinary-antibiotics-in-irelandduring-2012.pdf</a>	2009

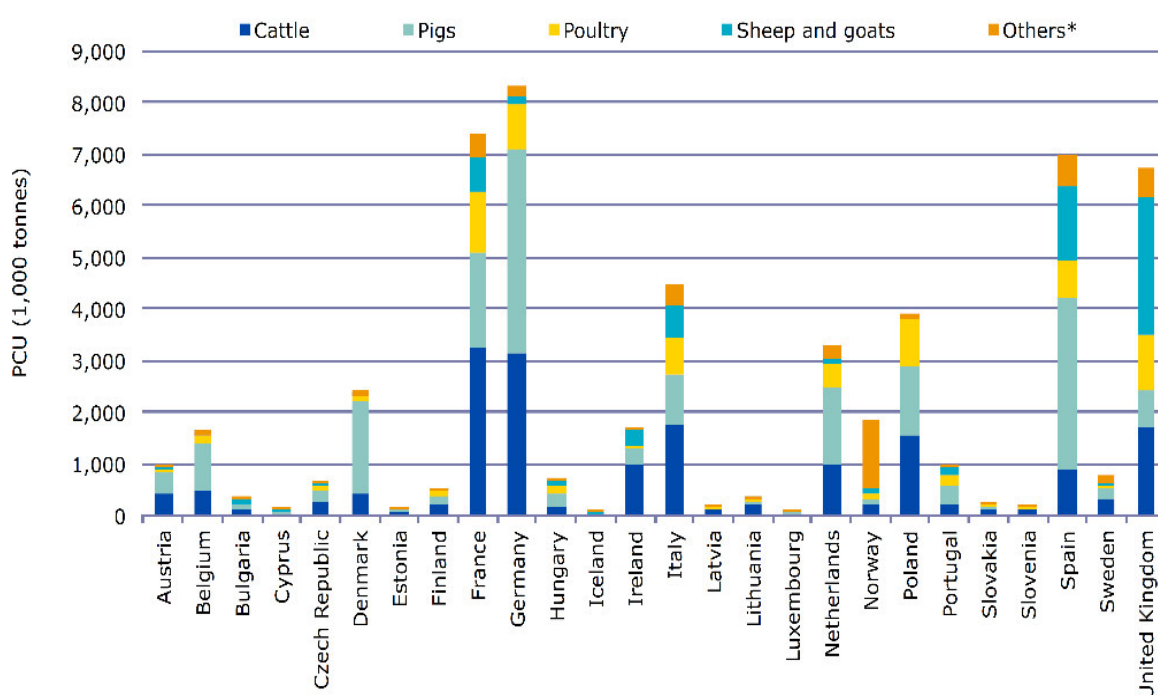
**Fortsetzung Tabelle 6: Monitoringprogramme bzw. Berichte über den Antibiotikaverbrauch in der Veterinärmedizin europäischer Länder [131]**

<b>Land</b>	<b>Programm /Bericht</b>	<b>Link</b>	<b>Datenerhebung ab:</b>
Niederlande	Monitoring von antimikrobiellen Resistenzen und Antibiotikaverbrauch bei Tieren in den Niederlanden - NETHMAP-MARAN; Antibiotikaverbrauch in Nutztieren in den Niederlanden – Sda-Bericht	<a href="http://www.wageningenur.nl/upload_mm/7/8/9/52388c6c-858c-483c-b57d-227029fe778a_005738_Nethmap_2013%20def_web.pdf">http://www.wageningenur.nl/upload_mm/7/8/9/52388c6c-858c-483c-b57d-227029fe778a_005738_Nethmap_2013%20def_web.pdf</a> <a href="http://www.autoriteitdiergeheesmiddelen.nl/en/publications">http://www.autoriteitdiergeheesmiddelen.nl/en/publications</a>	2003
Norwegen	Bericht über den Verbrauch antimikrobieller Substanzen und Vorkommen von antimikrobiellen Resistenzen in Norwegen in Tieren und Menschen - NORM/NORM-VET	<a href="http://www.vetinst.no/eng/Publications/Norm-Norm-Vet-Report">http://www.vetinst.no/eng/Publications/Norm-Norm-Vet-Report</a>	1999
Polen	Chief Veterinary Inspectorate. Dane dotyczące sprzedaży produktów leczniczych weterynaryjnych przeciwbakteryjnych w Polsce	<a href="http://www.wetgiw.gov.pl/index.php?action=art&amp;a_id=4417">http://www.wetgiw.gov.pl/index.php?action=art&amp;a_id=4417</a> ; in Polnisch	2011
Portugal	Nationaler Monitoringbericht über den Verbrauch antimikrobieller Substanzen - DGV 2011	<a href="http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/noticia/?detalhe_noticia=3588709">http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/noticia/?detalhe_noticia=3588709</a>	2011
Spain	Verkauf von antimikrobiellen Substanzen in Spanien	<a href="http://www.aemps.gob.es/en/informa/notasInformativas/medicamentosVeterinarios">http://www.aemps.gob.es/en/informa/notasInformativas/medicamentosVeterinarios</a>	2010
Schweden	Verbrauch von antimikrobiellen Substanzen und Auftreten antimikrobieller Resistenzen in Schweden - SWEDRES-SVARM	<a href="http://www.sva.se/en/Antibiotika/SVARM-reports/">http://www.sva.se/en/Antibiotika/SVARM-reports/</a>	2000
Schweiz	Bericht über den Vertrieb von Antibiotika in der Veterinärmedizin und das Antibiotikaresistenzmonitoring bei Nutztieren in der Schweiz- ARCH-VET	<a href="http://www.blv.admin.ch/dokumentation/04506/04518/index.html?lang=de">http://www.blv.admin.ch/dokumentation/04506/04518/index.html?lang=de</a>	2010
Großbritannien	Kontrolle der Verkaufszahlen von Antibiotika und Überwachung antibiotischer Resistenz in der Veterinärmedizin- UK-VARSS	<a href="http://www.vmd.defra.gov.uk/pdf/varss.pdf">http://www.vmd.defra.gov.uk/pdf/varss.pdf</a>	2006

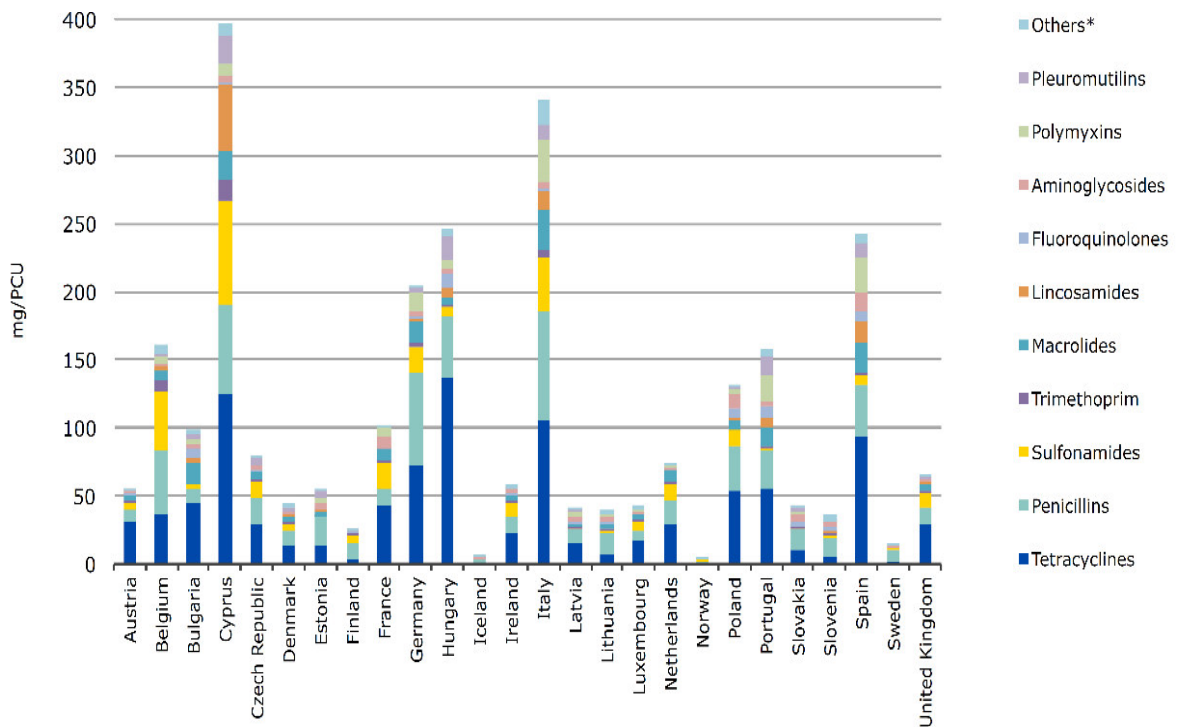
Der vierte und aktuellste ESVAC-Bericht beschreibt den Antibiotikaverbrauch der Tierhaltung im Jahr 2012. Wird der Verbrauch aller 26 Länder summiert, so wurden Tetracycline mit 37%, Penicilline mit 22% und Sulfonamide mit 10% am häufigsten eingesetzt. Makrolide wurden mit 8% der Gesamtmenge, Cephalosporine der 3./4. Generation mit 0,2% und Fluorchinolone mit 1,7% eingesetzt. Die drei letztgenannten Antibiotikaklassen werden von der WHO als *critically important antimicrobials* (CIA) eingestuft, d.h. es sind Reserveantibiotika mit hoher Priorität für die Humanmedizin.

ESVAC führte eine technische Größe ein, um die Antibiotikaverkaufszahlen für Größe und Art der Tierpopulation in den Ländern zu summieren und vergleichbar zu machen. Es wird die PCU (*population correction unit*) berechnet, 1 PCU entspricht 1 kg Körpermasse der verschiedenen Nutztierkategorien. Für die Tiere wird ein Gewicht geschätzt, welches sie am wahrscheinlichsten zum Zeitpunkt der Antibiotikabehandlung haben.

Deutschland hat von allen Ländern die höchste PCU, so ist es verständlich, dass Deutschland mit 1707 t (2012, DIMDI) verkauften Antibiotika den höchsten Antibiotikaverbrauch aufweist. Die wenigstens Antibiotika mit 0,7 t wurden in Island abgegeben (siehe Abbildung 4). Wird der Quotient Antibiotikaverbrauch pro PCU gebildet, so sind Italien und Zypern mit über 300 mg/PCU als Hochverbraucher zu erkennen. Deutschland liegt mit 200 mg/PCU im oberen Mittelfeld. Niedrigverbraucher sind Dänemark mit 44 mg/PCU und die Niederlande mit 75 mg/PCU. Norwegen hat mit 3,8 mg/PCU den geringsten Antibiotikaverbrauch. Abbildung 5 zeigt den Verbrauch aufgeteilt nach Antibiotikaklassen in den Ländern [131].



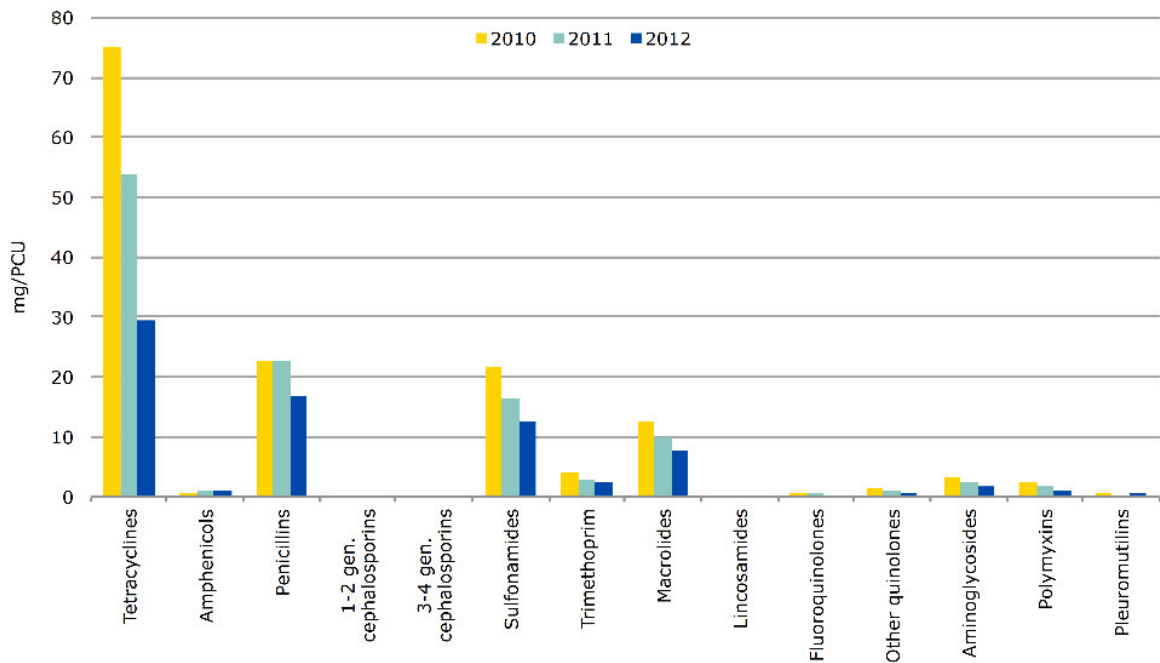
**Abbildung 4: PCU (population correction unit) in 1.000 Tonnen von lebensmittelliefernden Tieren für das Jahr 2012 [131]**



**Abbildung 5: Antibiotikaverkaufszahlen in mg/PCU eingeteilt nach den Antibiotikaklassen [131]**

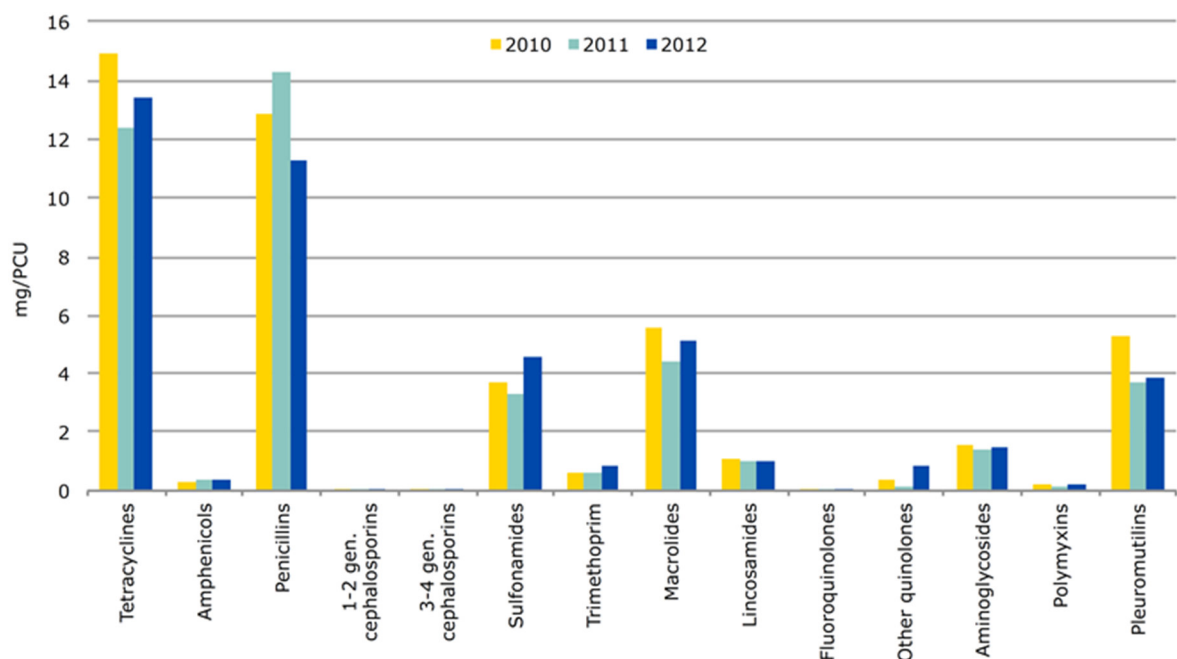
Im Bericht 2012, im dritten Jahr der Datenerfassung, wurden erstmals Jahresvergleiche dargestellt. Ein zusammengefasster Vergleich über 20 Länder zeigt eine Abnahme des Antibiotikaverbrauchs um 15% bei gleichbleibender PCU.

In den Niederlanden ist ein deutlicher Abfall des Antibiotikaverbrauchs zu erkennen. Es konnte in allen Antibiotikaklassen, außer den Fenicolen, der Einsatz reduziert werden. Die Maßgaben der Politik, den Antibiotikaeinsatz kontinuierlich zu reduzieren (2015: -70% bzgl. 2009), werden eingehalten. Seit 2013 ist zudem die Nutzung von Reserveantibiotika ohne vorherigen Sensibilitätstest verboten. Außerdem verpflichten sich Landwirte, die Mitglied in einem Prüfsystem der Wirtschaft sind, auf die Nutzung der 3./4. Generation der Cephalosporine beim Schwein gänzlich und bei den Milchkühen, beim Trockenstellen zu verzichten [131].



**Abbildung 6: Vergleich der Verkaufszahlen in mg/PCU an Antibiotika in den Niederlanden von 2010 bis 2012 [131]**

In Dänemark, dem zweiten prominenten Land, das durch politische Maßnahmen den Antibiotikaverbrauch zu reduzieren versucht, ist zumindest in den Jahren 2010 bis 2012 kein Effekt bzw. ein sehr geringer Effekt von 7% Reduktion zu erkennen. Auch die Einführung der „gelben Karte“ scheint bisher keine Reduktion zu liefern [131].



**Abbildung 7: Antibiotikaverkäufe in Dänemark, Vergleich in den Antibiotikaklassen über die Jahre 2010 bis 2012 [131]**

### 3.3.12 EU-Behörden

Mit dem Thema Antibiotika befassen sich drei Behörden auf EU-Ebene. Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA, European Food Safety Authority), das Europäische Zentrum für Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (ECDC, European Center for Disease Prevention and Control) und die Europäische Agentur für Arzneimittel (EMA, European Medicine Agency). Diese drei Behörden haben 2015 zum ersten Mal einen gemeinsamen Bericht abgegeben. Der Bericht [132] umfasst eine integrierte Analyse des Verbrauchs antimikrobieller Substanzen und Vorkommen von antimikrobiellen Resistenzen in Bakterien von Menschen und Lebensmittel-liefernden Tieren. Weitere 21 wissenschaftliche Richtlinien und Empfehlungen wurden in den letzten 6 Jahren von der EMA herausgegeben.

Auch die EFSA verfasste seit 2004 29 Berichte und wissenschaftliche Meinungen zu antimikrobieller Resistenz. Als Beispiel sind die technischen Spezifikationen genannt, die für die Stichproben im Resistenzmonitoring bei Zoonose- und kommensalen Bakterien gelten [133]. Die dritte Behörde, die ECDC veröffentlichte 48 Berichte seit 2006, darunter der jährliche Bericht des Netzwerkes zur Überwachung antimikrobieller Resistenzen (EARS-net).

Den Behörden sind darüber hinaus das europäische Referenzlabor für antimikrobielle Resistenzen (EURL-AMR) und das europäische Komitee zur antimikrobiellen Sensibilitätstestung (EUCAST) unterstellt.

#### *Aktionsplan*

Eine Übersicht aller Dokumente und Maßnahmen, die die EU in den letzten Jahren bezüglich des umsichtigen Umgangs mit Antibiotika veranlasst hat, ist im Zwischenbericht (*progress report* [134]) des 12 Punkte-Aktionsplans zur Abwehr der Antibiotikaresistenz nachzulesen.

Der Aktionsplan wurde im November 2011 von der Kommission erlassen und gliedert sich in sieben Bereiche, in denen die Maßnahmen am dringendsten sind:

- Sicherstellung, dass Antibiotika sowohl beim Menschen als auch beim Tier angemessen eingesetzt werden,
- Prävention bakterieller Infektionen und ihrer Ausbreitung,
- Entwicklung neuer wirksamer Antibiotika oder Behandlungsalternativen,
- Zusammenarbeit mit internationalen Partnern zur Eindämmung der Risiken der Antibiotikaresistenz,
- Verbesserung von Monitoring und Überwachung in der Human- und der Veterinärmedizin,
- Forschung und Innovation,
- Öffentlichkeitsarbeit, Aufklärung und Schulung.

### *Arzneimittelzulassung*

Tierarzneimittel dürfen nur mit einer Zulassung in den Verkehr gebracht werden. Festgelegt wurde dies in der Richtlinie 65/65/EWG<sup>1</sup>, mit der 1965 erstmalig ein europäischer Rechtsrahmen für Tierarzneimittel geschaffen wurde. Weitere Richtlinien und Verordnungen über die Produktion, das Inverkehrbringen, den Handel und die Verwendung folgten, die 2001 in einem Tierarzneimittelkodex (Richtlinie 2001/82/EG<sup>2</sup>) mündeten. Zusammen mit der Verordnung (EG) Nr. 726/2004<sup>3</sup> und dem Gemeinschaftskodex für Humanarzneimittel (Richtlinie 2001/83/EG) wird der gesamte Prozess der Zulassung, der Herstellung, des Inverkehrbringens, des Vertriebs, der Pharmakovigilanz (Überwachung der Sicherheit von Arzneimitteln) und der Verwendung von Arzneimitteln geregelt. Auch wird die Grundlage für die Errichtung einer Europäischen Arzneimittel-Agentur geschaffen. Im Anhang der Verordnung befindet sich eine Liste mit vorzulegenden Daten bei Antrag auf Zulassung eines Arzneimittels. Hierbei müssen z.B. Umweltrisiken abgeprüft werden, diese können aber nur bei Tierarzneimitteln zur Verweigerung der Zulassung führen [135]

Am 10. September 2014 hat die EU-Kommission Vorschläge zu Gesetzesänderungen zur Stärkung des Regulierungsrahmens bei Tier- und Fütterungsarzneimitteln an das europäische Parlament gegeben. Die Änderungen beziehen sich auf die Erteilung der Zulassung und Verwendung von Tierarzneimitteln. So sollen bestimmte Wirkstoffe der Humanmedizin vorbehalten und Voraussetzungen geschaffen werden, um Informationen über die Verwendung von Tierarzneimitteln zu sammeln. Es soll der vorbeugende Einsatz von Antibiotika in Fütterungsarzneimitteln verboten werden. Die Dosierung der Arzneimittel soll hier genauer gestaltet werden, um subtherapeutische Dosen zu vermeiden, genauso sollen Grenzwerte für Antibiotika-Rückstände im normalen Futtermittel eingeführt werden. All dies soll das Risiko von Antibiotikaresistenzen mindern. Ferner sollen Zulassungen von Antibiotika überprüft werden, damit der Nutzen-Risiko-Faktor auf der Nutzen-Seite bleibt. Weiterhin werden Richtlinien zum umsichtigen Umgang mit Antibiotika in der Veterinärmedizin erstellt. Diese sollen als Vorlage oder Grundlage von nationalen Strategien und Aktionen dienen.

## **3.4 Antibiotika in der Umwelt**

### *Umweltrisikoprüfung*

Neue Arzneimittel müssen ein Zulassungsverfahren durchlaufen, dazu gehört auch eine Umweltrisikoprüfung. Das deutsche Arzneimittelrecht schreibt diese seit 1998 vor. Zuständig für die Bewertung der Prüfungen ist das Umweltbundesamt (UBA). Entscheidungen über

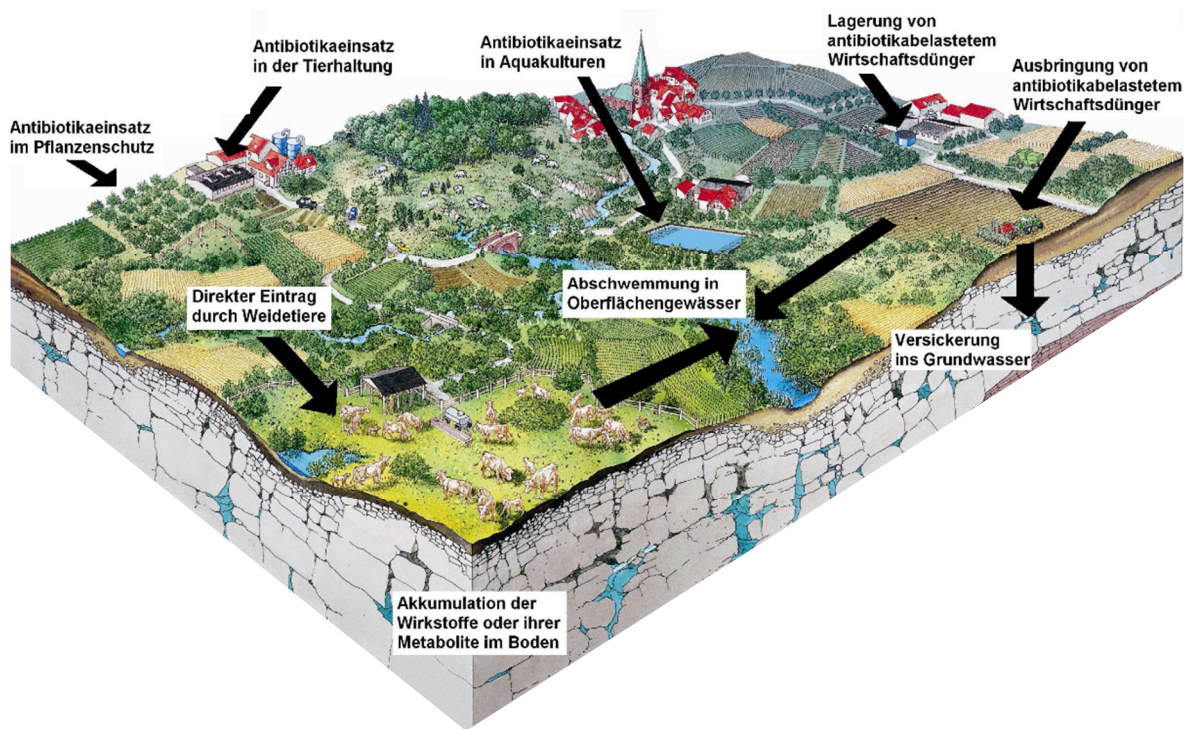


Maßnahmen zum Schutz der Umwelt trifft das UBA gemeinsam mit den Zulassungsbehörden (für Humanarzneimittel das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, BfArM und für Tierarzneimittel das BVL).

Die Umweltbewertung erfolgt zweigeteilt. Zunächst wird die Menge, die in die Umwelt gelangt/gelangen könnte, abgeschätzt (PEC-Wert). Übersteigt diese Menge einen bestimmten Grenzwert, so müssen Beurteilungen erfolgen, welche Auswirkungen das Arzneimittel auf die Umwelt haben kann. Hier wird der PEC/PNEC-Ansatz verfolgt: Es wird das Verhältnis der voraussichtlichen Umweltkonzentration (PEC, *predicted environmental concentration*) zur voraussichtlichen umweltunbelastenden Konzentration (PNEC, *predicted no effect concentration*) gebildet, bei  $PEC/PNEC < 1$  hat das Arzneimittel die Umweltprüfung bestanden. Zur Bestimmung der PEC und PNEC-Werte stehen VICH-Leitfäden (*International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products*), wie Listen mit durchzuführenden Tests sowie Kriterien zur Umweltbewertung zur Verfügung. Die Nutzen-Risiko-Betrachtung erfolgt grundsätzlich zugunsten der menschlichen Gesundheit, d.h. eine ausgehende Umweltbelastung vom zuzulassenden Humanarzneimittel kann nicht zu einer Verweigerung der Zulassung führen, bei Tierarzneimitteln ist dies jedoch möglich. Arzneimittel, die vor der Einführung der Umweltrisikoprüfung zugelassen wurden, sind nicht auf ihre Umweltwirkung geprüft. Einige von ihnen werden aber in der Umwelt nachgewiesen (z.B. Sulfamethoxazol im Grundwasser oder Tetracycline im Boden). Deswegen sind nachzuholende Umweltprüfungen in der Diskussion [4].

### *Eintragspfade*

Die Eintragspfade von Antibiotika in der Umwelt sind vielfältig (siehe Abbildung 8). So können diese über den Kläranlagenablauf, über das Sickerwasser von Mülldeponien, über Wirtschaftsdünger oder durch Stallstäube aus der Landwirtschaft, durch Aquakulturen von Fischfarmen, durch die Verwendung von Antibiotika auf Obstplantagen, durch den Abwasserabfluss der pharmazeutischen Industrie oder auch durch Abfälle der Ethanolproduktion in die Umwelt gelangen [136–138]. Die meisten Untersuchungen zum Vorkommen von Arzneimitteln gibt es für Oberflächengewässer und Kläranlagenabflüsse, aber auch im Grundwasser und Boden wurden Arzneimittel gefunden (siehe Tabelle 9) [59, 139–146]. Während der Eintrag von Antibiotika in Oberflächengewässern vorwiegend durch Humanarzneimittel über die Kläranlagen geschieht, erfolgt der Eintrag in den Boden hauptsächlich durch Wirtschaftsdünger [147]. Nach Beek *et al.* (2014) ist das städtische Abwassersystem der dominante Emissionsweg von Arzneimitteln in die Umwelt. Industrielle oder landwirtschaftliche Einträge sind je nach Eintragspfad und Art des Antibiotikums und Umweltkompartiment regional gering oder stark [148].



**Abbildung 8: Mögliche Eintragspfade von Antibiotika in die Umwelt [149, 150]**

Antibiotika werden nach oraler Gabe, beim Menschen und auch beim Tier, auf Grund ihrer Pharmakokinetik nur unzureichend im Darm resorbiert und damit über Fäzes wieder ausgeschieden. Somit kann im Stuhl/Kot eine unterschiedliche Menge an Antibiotika enthalten sein [151]. Bei einigen Antibiotika wird die verabreichte Menge bis zu 90% wieder ausgeschieden [152]. Tetracycline werden nach Kroker (1983) und Grafe (2001) zu etwa 80 % über den Kot ausgeschieden [15, 153, 154]. Je nach verabreichtem Antibiotikum ist neben dem ursprünglichen Wirkstoff ein erheblicher Anteil von aktiven und inaktiven Metaboliten zu detektieren. Auch Umwandlungen von inaktiven Formen in aktive Formen sind möglich [15]. Auch äußerlich angewendete Antibiotika, solche in Salben oder Sprays, gelangen durch Abwaschen in das Abwasser und die Gülle.

### 3.4.1 Antibiotika in Wirtschaftsdünger

Beispiele für Antibiotika, die üblicherweise zur Behandlung bei Schweinen, Rindern und Puten angewendet werden, sind Tetracycline, Tylosin, Sulfamethazin, Amprolium, Monensin, Virginiamycin, Penicillin und Nicarbazin [151]. Vom Tier ausgeschiedene Antibiotika wer-

den während der Güllelagerung teilweise abgebaut. Einige, wie die Tetracycline, sind dennoch nach Monaten noch wiederzufinden [10, 155]. Beim Abbau in der Gülle scheinen lichtunabhängige abiotische Prozesse zu überwiegen:

Weiterhin kann ein chemischer Abbau durch z.B. Hydrolyse erfolgen und es kann zur Ausbildung von nicht extrahierbaren Rückständen kommen [156].

Eine Überblicksuntersuchung über die Belastung von 34 Gülle- und 35 Gärrestproben mit den mengenmäßig wichtigsten Veterinärantibiotika wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW durchgeführt [157]. Die Proben wurden auf verschiedene Einzelsubstanzen der Stoffgruppen Tetracycline, Sulfonamide und Fluorchinolone untersucht. In 71% dieser Proben waren Antibiotikarückstände nachweisbar [157]. In einer, von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft vorgenommenen Studie bei der Schweinegülle untersucht wurde, waren ebenfalls 71% der Proben positiv. Es konnte mindestens ein Antibiotikum in Konzentrationen bis zu 51 mg/kg (TC) detektiert werden. [158]. In einer Studie vom UBA wurden in 88% der untersuchten Gülleproben Antibiotika gemessen [159]. Tendenziell waren bei der NRW-Studie die Tierexkremente vom Schwein und vom Geflügel stärker belastet als die von Rindern [157]. Zu demselben Ergebnis kamen auch Motoyama *et al.* (2011) bei ihren Untersuchungen [160]. Tetracycline werden häufiger in den Gülleproben gefunden, Sulfonamide und Fluorchinolone traten vermehrt in den Gärrestproben auf. Es zeigte sich, dass die Gärreste nicht nur häufiger, sondern auch im Median mit höheren Wirkstoffkonzentrationen belastet waren als die Gülleproben [157]. Motoyama *et al.* (2011) untersuchten Klärschlamm und Gülle auf Rückstände pharmazeutischer Produkte. Fluorchinolone wurden im Klärschlamm und Sulfonamide im Geflügelmist sowie in Schweinegülle nachgewiesen. Bei der Schweinegülle waren außerdem noch Rückstände von CTC zu finden [160]. Karci und Balcioğlu (2009) detektieren die höchsten Antibiotikarückstände im Geflügelkot [161]. Kim *et al.* (2001) fassten in einer Übersicht zusammen, dass bis auf eine Studie Gülle vom Schwein gegenüber Rind und Geflügel immer die höheren Antibiotikakonzentrationen aufwies [151]. Die Tabelle 7 und Tabelle 8 zeigen einen Überblick über die in der Literatur beschriebenen, maximalen Antibiotikarückstände in Tierexkrementen von Schwein und Geflügel.

**Tabelle 7: Antibiotikarückstände in Schweinegülle, ergänzt nach [162]**

Negativbefunde, sowie Befunde unterhalb der Bestimmungsgrenze sind nicht einbezogen worden. Vereinzelt wurden Gärreste untersucht und es konnte teilweise nicht zwischen Schweine- und Rinder- bzw. Kälbergülle unterschieden werden.

<b>Antibiotikum</b>	<b>Antibiotika- klasse</b>	<b>Maximalge- halte [µg/kg]</b>	<b>Literatur</b>
Ciprofloxacin	Fluorchinolon	6 - 2.000	[157, 160, 163, 164]
Enrofloxacin	Fluorchinolon	40 - 8.300	[59, 157, 163–165]
Levofloxacin	Fluorchinolon	3	[160]
Lincomycin	Lincosamid	4	[166]
Monensin	Makrolid	297	[166]
Tylosin	Makrolid	170 - 320	[163, 166, 167]
Tiamulin	Pleuromutilin	27 - 40	[166, 168]
Salinomycin	Polyether	10	[168]
Bacitracin	Polypeptid	780	[167]
Sulfachloropyridazin	Sulfonamid	1	[166]
Sulfadiazin	Sulfonamid	1100 - 235.000	[9, 159, 169–171]
Sulfadimethoxin	Sulfonamid	1 - 600	[169, 170, 172]
Sulfadimidin	Sulfonamid	14 - 167.000	[9, 159, 163–165, 169–172]
Sulfamerazin	Sulfonamid	1 - 900	[166, 170]
Sulfamethazin	Sulfonamid	3 - 8.700	[9, 166, 171–173]
Sulfathiazol	Sulfonamid	100 - 12.400	[169, 170, 173]
Sulfonamide	Sulfonamid	840	[174]
Chlortetracyclin	Tetracyclin	280 - 330.000	[9, 157–160, 163–165, 165–167, 169, 170, 175, 176]
Doxycyclin	Tetracyclin	700 - 1.000	[158, 170, 176]
Oxytetracyclin	Tetracyclin	13 - 140.000	[9, 157–160, 164–166, 177]
Tetracyclin	Tetracyclin	15 - 66.000	[9, 157–159, 159, 160, 164, 165, 165, 166, 169, 170, 172–174, 178, 179]

**Tabelle 8 Antibiotikarückstände in Geflügelmist, ergänzt nach [162]**

Negativbefunde, sowie Befunde unterhalb der Bestimmungsgrenze sind nicht einbezogen worden. Der Geflügelmist enthielt mitunter auch Einstreu.

Antibiotikum	Antibiotika- klasse	Maximalgehalte [µg/kg]	Literatur
Enrofloxacin	Fluorchinolon	2.800 - 31.000	[164, 180, 181]
Flumequin	Fluorchinolon	52.000	[181]
Norfloxacin	Fluorchinolon	1.900 - 5.000	[180, 181]
Ciprofloxacin	Fluorchinolon	1.200 - 2.100	[164, 180]
Erythromycin	Makrolid	32	[181]
Tylosin A	Makrolid	13.700	[181]
Tilmicosin	Makrolid	85	[181]
Trimethoprim	Pleuromutilin	3.400 - 17.000	[164, 165, 181]
Sulfadiazin	Sulfonamid	5.800 - 91.000	[164, 165, 181]
Chlortetracyclin	Tetracyclin	360 - 2.000	[159, 164, 165]
Doxycyclin	Tetracyclin	78.500	[181]
Oxytetracyclin	Tetracyclin	1.000 - 1.100	[164, 165]

### 3.4.2 Antibiotika im Boden

Der Stofftransfer und die Stoffdynamik von antibiotisch wirkenden Stoffen im Boden sind komplex. Die Antibiotikaklasse, der pH-Wert, die Temperatur, die Feuchtigkeit, die vorhandenen Mikroorganismen sowie die physikalischen Eigenschaften des Bodens beeinflussen die Abbaurate einzelner Substanzen [182]. Die wiederholte Anwendung von antibiotikahaltigem Wirtschaftsdünger kann zur Anreicherung von Antibiotika in Böden führen [8, 178]. Die Sorption von Antibiotika am Boden wird durch zahlreiche Mechanismen, wie hydrophobe Eigenschaften, Ionenaustausch, Kationenbindung an Tonoberflächen, Oberflächenkomplexation und Wasserstoffbrücken beeinflusst [183]. In der Literatur gibt es viele Hinweise über das Verhalten von Antibiotika im Boden. Ein niedriger pH-Wert und ein hoher Anteil an organischen Stoffen haben einen positiven Einfluss auf die Sorption der Antibiotika [182, 184–192]. Kwon *et al.* (2011) postulierten nach Untersuchungen mit Sulfonamiden und Tetracyclinen, dass eine pH-Wert Erhöhung des Bodens durch Gülledüngung zur Auswaschung von Chemikalien führt [193]. Dies wird durch Beobachtungen vieler anderer Autorengruppen bestätigt. Die Sorption scheint zudem abhängig von der Antibiotikakonzentration zu sein. Das heißt, bei niedrigen Antibiotikakonzentrationen sorbiert ein hoher Anteil der Antibiotikarückstände und hohe Konzentrationen an Antibiotika führen zu einem

niedrigeren Sorptionsgrad [182]. Dabei können Konkurrenzeffekte zwischen natürlich vorkommenden Komplexbildnern und koordinationsfähigen Arzneistoffen eine Rolle spielen [194].

Die Bodenstruktur, z.B. das Vorhandensein von Makroporen (Wurmgänge, Wurzelkanäle), kann das Verhalten der Antibiotika im Boden beeinflussen [52]. Kay *et al.* (2005) beschreiben, dass es nach Zerstörung der Makroporen aufgrund von Bodenbearbeitung zu geringerem Antibiotikaabfluss kommt [141, 195]. Im Gegensatz dazu ist nach Stevens (2009) ein Transport von Sulfadiazin und CTC auch in Böden ohne ausgeprägte Makroporensysteme möglich [196].

Die Mobilität von Tetracyclinen im Boden ist gering [183]. Kwon *et al.* (2011) bestimmten die Auswaschmenge von Antibiotika in 30cm Bodensäulen [193]. Ihr Versuch bestätigt die höhere Sorption der Tetracycline. Auch Langzeituntersuchungen von Hamscher *et al.* (2007) [197] zeigten, dass TC über 10 Jahre im Boden nachweisbar ist. Ebenfalls bestätigen die Untersuchungen des Grundwassers die starke Sorption von TC am Boden. Der Anteil an organischer Substanz im Boden beeinflusst die Sorption der Tetracycline kaum. Sie wird hauptsächlich durch die Kationenaustauschkapazität und den Eisenoxidgehalt bestimmt, so Lertpaitoonpan *et al.* (2009) [192]. Gong *et al.* (2012) beschreiben ein Modell, welches besagt, dass der pH-Wert eine entscheidende Rolle im Boden-Wasser-Verteilungsprozess spielt. Auch sie beschreiben anhand ihrer Modellrechnung Eisen als wichtigen Faktor, der die Adsorptionskapazität von OTC, Sulfamethazin und Norfloxacin beeinflusst [198]. Wobei Pils und Laird (2007) wiederum feststellten, dass Schweinegüllekompost die Adsorption von Tetracyclinen erhöht: Umso mehr Kompost zugefügt wurde, umso mehr TC wurde adsorbiert. CTC wurde unter den gleichen Bedingungen mehr sorbiert als das bei OTC und TC der Fall war [199]. Möglicherweise stellt der Kompost zusätzliche Sorptionsplätze zur Verfügung, so dass die Tetracycline weniger ausgewaschen werden. Chefetz *et al.* (2008) und Graber und Gerstl (2011) zeigten, dass die Sorption von gelöster organischer Substanz die Sorption von Kontaminanten (Medikamente, Hormone, Pestizide) an Bodenoberflächen inhibierte, da es zur Konkurrenz um die Bindestellen kommt (siehe unten) [200, 201]. Subbiah *et al.* (2011) beschreiben, dass der Rückgang der Antibiotikakonzentration im Boden hauptsächlich durch Adsorptionsmechanismen und bei Tetracyclinen auch durch den abiotischen Abbaumechanismus, die Hydrolyse, erfolgt. Ein biologischer Abbau fand nicht statt, da die Zugabe von Natriumazid, welches alle Mikroorganismen abtötet, zu keiner Änderung der Ergebnisse führte [202].

Die Sorption war am größten bei schluffigen Lehm Böden, gefolgt von sandigem Lehm. Sandböden zeigten die geringste Sorption [202]. Da sandiger Lehm Boden den pH-Wert schneller

wieder anpassen kann, ist in diesen Böden die Sorption weniger von pH-Wert Änderungen betroffen [182].

Im Gegensatz zu den Tetracyclinen wird AMO von Kim *et al.* (2012) als hochmobil im Boden beschrieben [203].

Yu *et al.* (2012) schreiben, dass über 90% des applizierten ENR von fünf verschiedenen Böden adsorbiert wurde. Bei Tonmineralien lag die Sorption bei über 98%, ENR lagert sich hier in die Mineralschichten ein [204]. Auch Untersuchungen von Uslu *et al.* (2008) ergaben für lehmigen Sand mit der höchsten Konzentration an organischem Material eine hohe Sorption von ENR. Außerdem hatte der pH Wert einen starken Einfluss, der höchste Sorptionsgrad lag bei einem pH Wert von 5,7 vor [205].

Untersuchungen aus Feldstudien und Bodensanierungsprojekten zeigten, dass Schadstoffe in Böden und Sedimenten länger persistierten als anhand ihres physikalischen und chemischen Verhaltens abgeschätzt werden konnte [206, 207]. Solche Beobachtungen, welche sich signifikant von den herkömmlichen Theorien zum Verhalten und Transport von Kontaminanten im Boden unterscheiden, deuten auf eine Gruppe von Schadstoffen im Boden hin, welche dadurch eine geringere Verfügbarkeit gegenüber mikrobiellem Abbau und chemischen Reaktionen besitzt. Generell wird angenommen, dass adsorbierte Schadstoffe zuerst in eine wässrige Phase (Bodenwasser) desorbieren müssen, um gegenüber biologischem Abbau und chemischen Reaktionen zugänglich zu sein [208]. So gelten beispielsweise auch Antibiotika, welche durch Wechselwirkungen mit der Bodenmatrix festgelegt (sequestriert) werden, als nicht mehr verfügbar [209]. Die Tabelle 9 gibt eine Literaturübersicht über die untersuchten und beschriebenen Antibiotikaklassen und ihre Nachweismengen im Boden.

**Tabelle 9: Extrahierbare Antibiotikarückstände im Boden**

Es wurden Böden von Feldern, Feldversuchspartzellen und Lysimetern beprobt.

Antibiotikum	Antibiotika- klasse	Maximalge- halte [ $\mu\text{g/kg}$ ]	Literatur
Tetracyclin	Tetracyclin	39 - 395	[8, 9, 59, 159, 175, 210]
Chlortetracyclin	Tetracyclin	6 - 820	[8, 9, 59, 159, 164, 165, 167, 175, 211, 212]
Doxycyclin	Tetracyclin	250 - 728	[181, 213]
Oxytetracyclin	Tetracyclin	7 - 322	[175, 177, 210, 214]
Enrofloxacin/ Ciprofloxacin	Fluorchinolon	27 - 3800	[59, 164, 165, 180, 205, 215]
Norfloxacin	Fluorchinolon	96	[181]
Flumequin	Fluorchinolon	1331	[181]
Sulfadiazin	Sulfonamid	16	[159]
Sulfamethoxazol	Sulfonamid	6	[210]
Sulfamethazin	Sulfonamid	2 - 72	[9, 211]
Trimethoprim	Sulfonamid	60	[181]
Tylosin	Makrolid	32 - 679	[167, 181, 212]

### *Nicht extrahierbare Rückstände (NER)*

Je nachdem, welche analytische Methode zur Extraktion der Antibiotika aus dem Boden angewendet wird, werden entweder nur die löslichen Antibiotika bestimmt oder auch die, die an der Bodenmatrix haften. Antibiotika, die am Boden haften, werden auch als nicht extrahierbare Rückstände bezeichnet. Genauer ist ein nicht extrahierbarer Rückstand (NER) eine chemische Substanz, die im Sediment oder der Matrix gebunden bleibt, wenn Extraktionsmethoden verwendet werden, die die chemischen Eigenschaften der Rückstände oder die Struktur der Matrix nicht wesentlich ändern [216, 217]. Eschenbach *et al.* (2013) beschreiben vier Typen von nicht extrahierbaren Rückständen:

- NER-Typ 1: Hohe Sorption, aber extrahierbar mit matrixalternierenden Methoden, wie Lösungsmittlextraktion mit erhöhter Temperatur, erhöhtem Druck oder sonstigem Energieinput, wie z.B. Mikrowellen.
- NER-Typ 2: Physikalischer Einschluss, extrahierbar durch Destabilisierung des organischen Materials mittels z. B. Chelatbildnern, wie EDTA.
- NER-Typ 3: Irreversible Bindung, Bestimmung der Rückstände durch sequentielle chemische Abbaumethoden oder durch Immunoassay.
- NER-Typ 4: Biogene Fixierung, Extraktion von Biomolekülen, wie Fett- oder Aminosäuren und Bestimmung der Biomasse.

Eschenbach *et al.* (2013) bezeichnen die Rückstände Typ 1 und Typ 2 als verstecktes Risiko, da diese Rückstände unter bestimmten Bedingungen auch in der Natur remobilisiert werden können [216]. Viele Analyseverfahren, wie auch die in dieser Arbeit, beziehen diese beiden Gruppen bei der Bestimmung des Antibiotikarückstandes im Boden mit ein.

### 3.4.3 Antibiotika in Pflanzen

Die Aufnahme von Antibiotika in Pflanzen ist in verschiedenen Studien untersucht worden: Goktas *et al.* (2011) simulierten die Aufnahme von Kontaminanten aus dem Boden in Pflanzen. Sie überprüften den Einfluss zahlreicher Faktoren auf die Aufnahme von Kontaminanten (organisch, neutral und ionisch) und schlussfolgerten eine hohe Komplexität bei der Beeinflussung bezüglich Verdunstung, Versickerung und Wasseraufnahme durch die Wurzel, was zu entscheidenden Konsequenzen für den Verbleib von Kontaminanten im Boden führt. Sie bezogen Modelle für den Vegetationszyklus, die Bodenfeuchteverteilung und den Kontaminantentransport im Boden mit ein. Im Ergebnis wurde deutlich, dass die Aufnahme von Kontaminanten in die Pflanze durch zahlreiche Faktoren beeinflusst wird und diese während des Wachstums variieren kann [218].



Jones-Lepp *et al.* (2011) untersuchten die Aufnahme von Antibiotika (Azithromycin, Clindamycin, Roxithromycin) durch Pflanzen im Gewächshausexperiment. Hierzu wurden Salat, Spinat und Möhren in Sand gepflanzt und mit antibiotikahaltigem Wasser in einer Konzentration von 0,1 bis 1000 ng/L bewässert. Die Pflanzen nahmen die Antibiotika in geringem Maße auf (siehe Tabelle 10) [219].

Versuche von Boxall *et al.* (2006) in Pflanzenwachstumschamern zeigten, dass Möhren und Salat Florfenicol, Levamisol und Trimethoprim aufnehmen können. In Möhrenwurzeln wurden ENR, Florfenicol, Diazinon und Trimethoprim detektiert (siehe Tabelle 10). AMO, OTC, Phenylbutazon, Sulfadiazin und Tylosin wurden von den Pflanzen nicht nachweisbar aufgenommen. Außerdem wurde festgestellt, dass das Pflanzenwachstum durch OTC und ENR gehemmt wird. [220].

Xiao *et al.* (2012) prüften die Aufnahme von Ciprofloxacin in Chinakohl, Rettich, Tomate und Schlangenbohne im Gefäßversuch, bei Zugabe von 5, 30 und 75 mg/kg Ciprofloxacin. Diese Antibiotikamenge hatte hier keinen Einfluss auf das Wachstum der Pflanzen. Die größte Menge an Ciprofloxacin wurde in den Wurzeln gefunden, aber auch in der Tomate und der Bohne waren Antibiotika festzustellen, wobei die Aufnahmemenge von der Bodenkonzentration abhängig war [221].

Eggen *et al.* (2011) untersuchten ebenfalls die Aufnahme von Ciprofloxacin in Möhre und Gerste unter Gewächshausbedingungen. Sie stellten fest, dass die Aufnahme in die Wurzel höher war als die Translokation in das Blatt. Im Korn konnten dagegen keine Antibiotika detektiert werden. Außerdem beobachteten sie, dass Ciprofloxacin das Wachstum der Möhrenpflanzen negativ beeinflusst. Die im Versuch gewählte Antibiotikakonzentration im Boden mit 6-10 mg/kg Trockenmasse war vergleichbar mit „worst case“ Fällen [222].

Kumar *et al.* (2005) zogen Mais, Frühlingszwiebel und Kohl im Gewächshaus an und düngten mit antibiotikahaltiger Gülle. Alle drei Pflanzen nahmen geringe Mengen (2-17 µg/kg Frischgewicht (FG)) CTC auf, wobei die Aufnahme mit steigendem Antibiotikagehalt im Boden zunahm. Tylosin wurde von den Pflanzen nicht aufgenommen [223].

Wu *et al.* (2010) pflanzten im Gewächshaus Sojabohnen an. Sie düngten mit antibiotikahaltigem Klärschlamm. In den Wurzeln, den Blättern und der Bohne konnten Carbamazepin, Triclosan und Triclocarban detektiert werden [224].

Dolliver *et al.* (2007) untersuchten die Aufnahme von Sulfamethazin in Mais, Kopfsalat und Kartoffel unter Gewächshausbedingungen. Alle drei Pflanzen nahmen bis 1,2 mg Sulfamethazin/ kg Trockenmasse auf, wobei Mais und Salat am meisten aufnahmen. Es war jedoch weniger als 0,1% der Antibiotikafracht (100 mg Antibiotika/Liter Gülle), die mit der Gülle auf den Boden aufgebracht worden war [225].

Nerlich *et al.* (2009) gingen bei ihren Versuchen von einer permanenten antibiotischen Behandlung eines Tieres aus und zogen die daraus resultierende Antibiotikakonzentration im Urin des Tieres für die Berechnung der Dotierungskonzentration von Versuchspflanzen heran. Diese nicht praxisrelevante Dotierung führte im Modellversuch zu deutlichen CTC-Konzentrationen in den Pflanzen. Nach acht Wochen Kultivierung konnten in den Maispflanzen bis zu 29 µg/kg FG CTC wiedergefunden werden. Weiterführende Freiland- und Gefäßversuche mit realistischen als auch mit „worst case“-Konzentrationen an ENR und TC führten in den zu unterschiedlichen Wachstumsstadien genommenen Proben zu keinem positiven Befund. Zur Abschätzung der Belastungssituation bei wirtschaftseigener Düngung von Kulturpflanzen in Praxisbetrieben wurden Silomaisproben aus landwirtschaftlichen Gebieten mit intensiver Schweinehaltung auf ENR und TC-Rückstände untersucht. Die Analysen zeigten ebenfalls keine Rückstände im Erntegut, gemessen wurde mit HPLC-FLD oder -DAD oder -MS [226].

Boonsaner *et al.* (2010) detektierten in ihren Versuchen OTC und Norfloxacin in den Wurzeln von Sojabohnen, nicht aber im Spross und der Bohne selbst. Sie setzten vier Wochen alte Pflanzen auf antibiotikahaltigen Boden und stellten fest, dass innerhalb der ersten sechs Tage die Konzentration an Antibiotika in der Wurzel anstieg. Nach 12 Tagen waren schließlich keine Antibiotika mehr in den Pflanzenwurzeln nachweisbar [227].

Im Vergleich zu Versuchen im Gewächshaus ist ein Freilandversuch wesentlich komplexer. Die Pflanzen sind der Witterung ausgesetzt. Es ist wesentlich mehr Boden vorhanden, in dem die Antibiotika sich verteilen, versickern und sorbieren können. Die Dauer eines Versuches im Gewächshaus beträgt meist nur einige Wochen, wobei in der landwirtschaftlichen Praxis die Pflanzen mehrere Monate wachsen, bis sie nach Beerntung rückstandanalytisch untersucht werden. Die Zeit, in der die Antibiotika aufgenommen und metabolisiert werden, ist somit deutlich verlängert. Die Pflanze kann während der längeren Versuchsdauer ein späteres Entwicklungsstadium erreichen. Rein *et al.* (2011) berechneten die Pflanzenaufnahme (Sommerweizen, Möhren) von Chemikalien wie Pestiziden oder Kontaminationen aus der Güllebeaufschlagung des Feldes. Sie gingen von einer kontinuierlichen sowie einer dynamischen Aufnahme, abhängig vom Entwicklungsstadium der Pflanze, aus. In den ersten 30 Tagen stimmten die Modelle überein, je mehr sich die Pflanze jedoch der Reife nähert, desto weniger Nährstoffe nimmt sie auf und damit weniger Fremdchemikalien, der Verlust durch Verdunstung bleibt jedoch gleich. Die Antibiotikakonzentration im Blatt und der in der Frucht wird somit zur Reife hin abnehmen. Für die Wurzeln errechnete sich keine Abhängigkeit zwischen Entwicklungsstadium und Kontaminantenkonzentration [228]. Darüber hinaus veranlasst der pflanzliche Metabolismus, dass Kontaminanten, darunter z.B. Antibiotika, in der Zellvakuole oder der Zellwand eingeschlossen werden [13]. Geschieht

der Einschluss der Antibiotika in die Zellwand z.B. durch Bindung an Lignin, so führt dies zu nicht extrahierbaren Rückständen [229, 230].

Die Studien von Grote *et al.* (2005 – 2010) zeigten geringe Tetracyclin-Rückstände im Getreide nahe der Bestimmungsgrenze von 18 µg/kg [10, 13, 16, 20, 231] und im Rotkohl eines praxisnahen Feldversuchs ENR-Rückstände von 9-17 µg/kg FG [21].

Gottschall *et al.* brachten auf einem Feld mit unterschiedlichen Bodenbereichen Klärschlamm aus, welcher bis zu 1 mg/kg Antibiotika enthielt. Die Untersuchung des darauf gewachsenen Weizens ergab keine Antibiotikarückstände im Korn [232].

Sabourin *et al.* (2012) führten einen Feldversuch mit Tomaten, Möhren, Kartoffeln und Zuckermais durch. Zur Düngung wurde Klärschlamm verwendet, der zuvor analysiert wurde: Die Antibiotikakonzentration bzw. die der Umwandlungsprodukte lag bei 4 µg/kg für Erythromycin-H<sub>2</sub>O und bis 6 mg/kg für Ciprofloxacin. Im Erntegut bestimmten sie Konzentrationen von 2 µg/kg Ciprofloxacin in Zuckermais und 6 µg/kg 4-Epianhydrotetracycline in Kartoffeln. Die Ergebnisse wurden jeweils in zwei bzw. einem der drei Replikate erzielt. Außerdem wurden Lincomycin, Minocyclin, Norfloxacin, Penicillin G, Sulfadimethoxin, Sulfamerazin und Trimethoprim mit 0,4 µg/kg bis 27 µg/kg Trockenmasse gefunden. Hier aber wurden die Antibiotika auch in den Kontrollpflanzen detektiert [233].

**Tabelle 10: Antibiotikaaufnahme in Pflanzen I**

Antibiotika im Gießwasser oder Gülle, dotierte Antibiotikakonzentration im Boden bei 1 mg/kg <sup>a</sup> Feldversuch <sup>b</sup> Gefäßversuch <sup>c</sup> Screening

Pflanze	Antibiotikum	Antibiotika-klasse	Maximalgehalte [µg/kg TM/FG]	Literatur
Zuckermais	Penicillin G	β-Lactam	5,7	[233] <sup>a</sup>
Möhre, Kopfsalat, Möhrenschnale	Florfenicol	Fenicol	5 - 38	[220] <sup>b</sup>
Zuckermais, Möhre	Ciprofloxacin	Fluorchinolon	2,1	[233] <sup>a</sup>
Roggen, Weizen, Möhre, Möhrenschnale, Rotkohl	Enrofloxacin	Fluorchinolon	0,5 - 8,5	[220] <sup>b</sup>
Möhre	Norfloxacin	Fluorchinolon	26	[233] <sup>a</sup>
Ruculablätter	Ofloxacin	Fluorchinolon	0,1	[234] <sup>b</sup>
Möhrenwurzel	Clindamycin	Lincosamid	53	[219] <sup>b</sup>
Ruculablätter, Tomate	Lincomycin	Lincosamid	0,1 - 1,2	[233, 234]
Bermudagrasswurzeln	Azithromycin	Makrolid	90	[219] <sup>b</sup>
Bermudagrasswurzeln	Clarithromycin	Makrolid	135	[219] <sup>b</sup>
Möhrenwurzel	Roxythromycin	Makrolid	115	[219] <sup>b</sup>
Tomate	Sulfadimethoxin	Sulfonamid	0,06	[233] <sup>a</sup>
Tomate	Sulfamerazin	Sulfonamid	0,5	[233] <sup>a</sup>
Kopfsalat, Kartoffel, Mais	Sulfamethazin	Sulfonamid	0,3 - 1	[225] <sup>b</sup>
Gurkenblätter, Tomatenblätter	Sulfamethoxazol	Sulfonamid	0,7 - 2	[235] <sup>b</sup>
Gurke, Gurkenblätter	Sulfapyridin	Sulfonamid	0,8 - 1,9	[235] <sup>b</sup>
Tomate, Möhrenschnale, Möhre, Kopfsalat	Trimethoprim	Folsäure-antagonist	0,4 - 6	[220, 233]
Mais, Winterweizen	Chlortetracyclin	Tetracyclin	29 - 95	[16, 226]
Winterweizen	Demeclocyclin	Tetracyclin	68,4	[16] <sup>c</sup>
Winterweizen	Doxycyclin	Tetracyclin	31,3	[16] <sup>c</sup>
Tomate	Minocyclin	Tetracyclin	16	[233] <sup>a</sup>
Kartoffel	Tetracycline	Tetracyclin	6,3	[233] <sup>a</sup>

Die Pflanzen aus Tabelle 10 stammten aus Screenings oder wurden in Gefäßversuchen angezogen, die Antibiotikagehalte im Gießwasser oder im Boden waren 1 µg/L bzw. 1 mg/kg, so dass bei den Versuchen realitätsnahe Antibiotikakonzentrationen vorlagen. In Tabelle 11 sind Studien aufgeführt, in denen die Antibiotikaaufnahme in Pflanzen bei höheren (5-200 mg/kg) Antibiotikakonzentrationen im Boden vorlagen.

**Tabelle 11: Antibiotikaaufnahme in Pflanzen II**

Gefäßversuche, Antibiotika im Gießwasser oder Gülle, dotierte Antibiotikakonzentration im Boden zwischen 5 mg/kg und 200 mg/kg

Pflanze	Antibiotikum	Antibiotika- klasse	Maximalgehalte [µg/kg FG/TM]	Literatur
Reis	Norfloxacin	Fluorchinolon	8.300 - 50.000	[236]
Rotkohl	Enrofloxacin	Fluorchinolon	17	[21]
Maiswurzel, Weidewurzel	Sulfadiazin	Sulfonamid	5.300 - 333.000	[237]
Tomate, Kopfsalat, Gurke	Sulfadimethoxin	Sulfonamid	1.800 - 20.900	[238]
Kopfsalat, Gurke, Tomate, Kartoffel, Mais	Sulfamethazin	Sulfonamid	0,4 - 42.500	[225, 238, 239]
Tomate, Kopfsalat, Gurke	Sulfamethoxazol	Sulfonamid	5.600 - 38.500	[238]
Reis, Tomate, Gurke, Kopfsalat	Chlortetracyclin	Tetracyclin	230 - 550.000	[236, 238]
Kopfsalat, Gurke, Tomate, Reis	Oxytetracyclin	Tetracyclin	35 - 29.400	[236, 238]
Tomate, Kopfsalat, Gurke	Tetracyclin	Tetracyclin	77 - 1.000	[238]

#### 3.4.4 Hydrokulturexperimente zur potentiellen Aufnahme von Antibiotika in Porree und Weißkohl

In einem dem RESET-Teilprojekt vorangegangenen Projekt sollte das Aufnahmepotential von verzehrstarkem Gemüse und in der Veterinärmedizin häufig angewendeten Antibiotika untersucht werden. Es wurden Porree und Weißkohl in Hydrokultur angezogen. Der Nährlösung wurden Sulfadiazin, ENR, TC, CTC oder Monensin in einer Dotierung von 5 µmol/L zugesetzt.

Im Vergleich zu den Kontrollansätzen waren äußerlich zum Teil deutliche Effekte durch die anwesenden Antibiotika in der Nährlösung zu sehen. So waren die jungen Blattabschnitte des Porrees aus der mit ENR dotierten Nährlösung deutlich ausgebleichter als die der Kontrollpflanzen. Im Weißkohl führte der ENR-Zusatz zu einer starken Gelbfärbung der jungen (inneren) Blätter. Für CTC wurden ähnliche, aber schwächere Effekte beobachtet. TC zeigte äußerlich keinen Einfluss.

Die Aufnahme der Antibiotika in die Pflanze wurde mittels LC-MS/MS gemessen. Die Analyse umfasste auch ausgewählte Umwandlungsprodukte. In den Porreewurzeln konnten 12 mg/kg (FG) TC und 7 mg/kg (FG) ENR detektiert werden. In den Blättern war die Aufnahme mit 0,05 mg/kg TC und 1 mg/kg ENR geringer. Im Weißkohl wurden in den Wurzeln

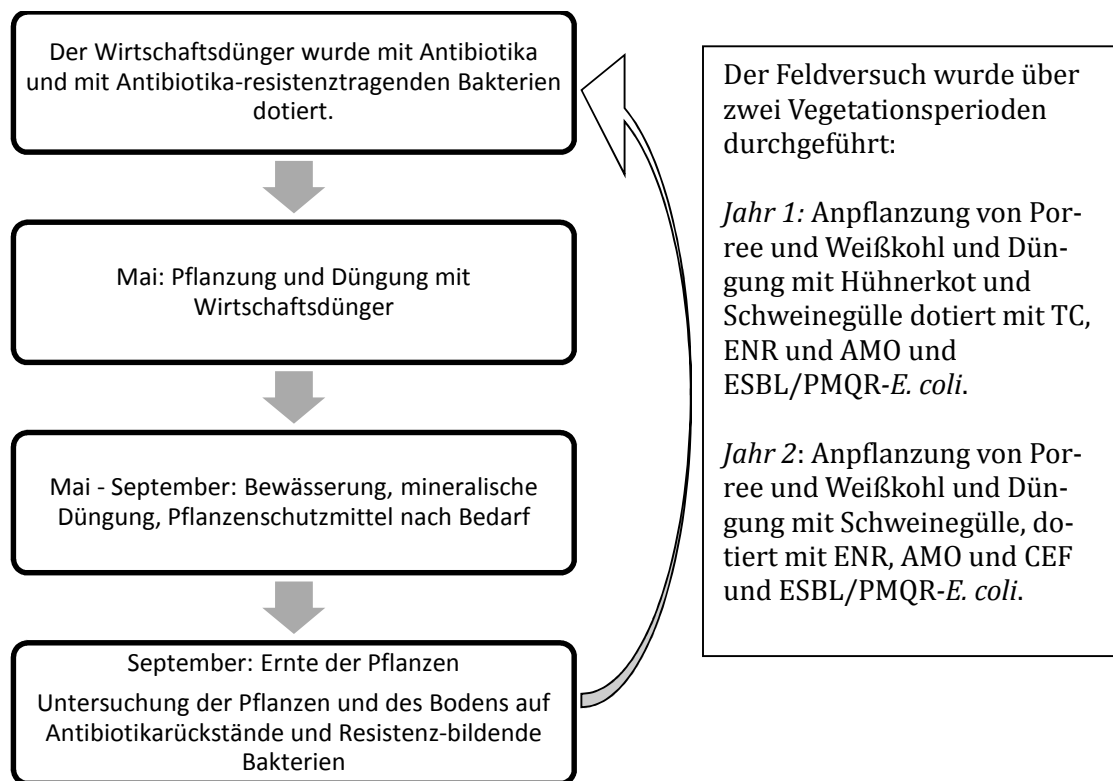
7 mg/kg TC und 12 mg/kg ENR und in den Blättern 0,1 mg/kg TC und 7 mg/kg ENR nachgewiesen [20].

Die Ergebnisse zeigen ein deutliches und hohes Aufnahmepotential, besonders für TC und ENR, so dass sich die Frage anschließt, welche Auswirkungen dies auf die Nahrungsmittelkette hat. Eine systematische Beprobung von Feldpflanzen ist erstrebenswert, um das Verbraucherrisiko möglicher Antibiotikakontaminationen einschätzen zu können. Zunächst wurde im Teilprojekt 8 von RESET 1 das Aufnahmepotential der gleichen Pflanzen unter praxisnahen Feldbedingungen untersucht.

## 4 Überblick zum methodischen Vorgehen

Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Modellversuch basiert auf Feldversuchen unter praxisnahen landwirtschaftlichen Bedingungen und der anschließenden Rückstandsanalytik der Antibiotika in Boden und Pflanzen sowie mikrobiologischen Untersuchungen. Zur Bestimmung der Aufnahme von Antibiotika in Gemüse aus Gülle-gedüngtem Boden wurden Porree- und Weißkohlpflanzen auf einem Versuchsfeld angepflanzt. Die Durchführung des Feldversuches ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt.

Für die Rückstandsanalytik wurden die bereits im Arbeitskreis an der Universität Paderborn entwickelten Methoden [17, 21, 240] adaptiert und gegebenenfalls weiterentwickelt. Zur Identifizierung und Quantifizierung von Antibiotika in Pflanzen-, Boden- und Gülleproben wurden nacheinander Fest-Flüssig-Extraktion, Festphasenextraktion (SPE, *Solid-Phase-Extraction*) und LC-MS-Methoden angewendet. Die ausführliche Beschreibung der Methoden ist im Anhang (S. 163, Kapitel B) aufgeführt. Die Untersuchung auf Antibiotikaresistenz bildende Bakterien wurde mikrobiologisch mittels Selektionstest und anschließender PCR (Polymerasekettenreaktion) und MALDI- (*Matrix-assisted laser desorption ionization*) MS-Analytik vom Institut für Tier- und Umwelthygiene an der FU Berlin durchgeführt.



**Abbildung 9: Schema zur Durchführung der Feldversuche**

## 5 Ergebnisse und Diskussion

---

### 5.1 Durchführung der Feldversuche - Einflüsse der Wetterbedingungen

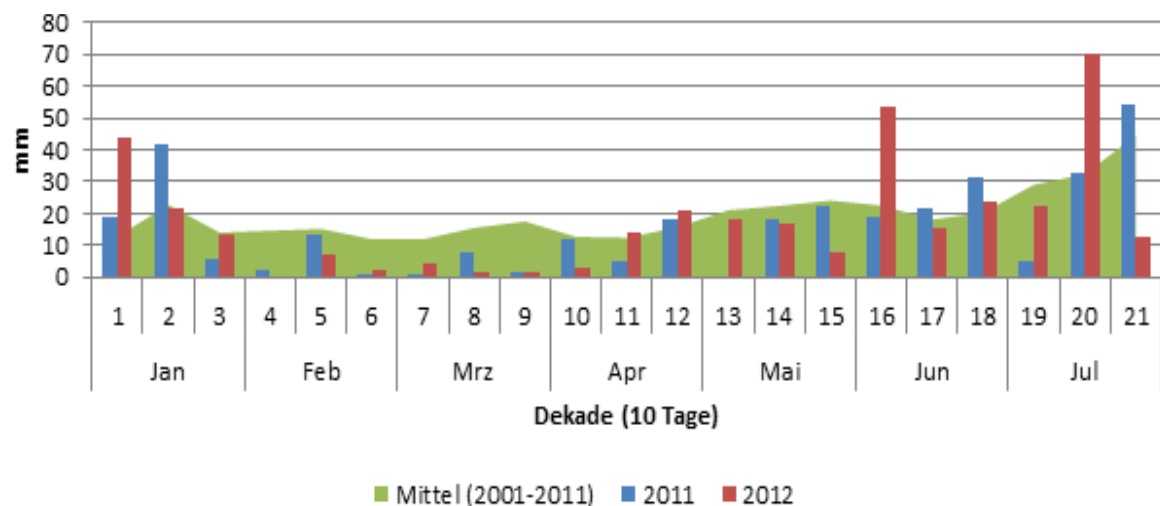
Ein Freilandversuch wird immer vom Wetter beeinflusst. Die Daten der Wetterstation im Versuchsgut Merklingsen sind in Abbildung 10 bis Abbildung 12 sowie Tabelle 12 aufgetragen.

Abbildung 10 zeigt die Niederschlagsverteilung in den Jahren 2011 und 2012 im Vergleich zum zehnjährigen Mittel. Eine Niederschlagssäule umfasst jeweils 10 Tage. Wird der Pflanzmonat Mai betrachtet, so zeigt sich, dass es Anfang Mai 2011 sehr trocken war, die anschließenden Wochen feuchter, aber weiterhin etwas trockener als das zehnjährige Mittel, Anfang Juli war wieder kaum Niederschlag zu verzeichnen. Im Vergleich dazu hat es 2012 Anfang Mai in etwa durchschnittlich viel geregnet, dafür war es Ende Mai trockener und Anfang Juni wesentlich nasser als das zehnjährige Mittel. Im Juli weicht die Niederschlagsmenge 2012 erneut vom Durchschnitt ab, Mitte Juli hat es mehr geregnet und Ende Juli weniger.

Zum Zeitpunkt der Pflanzung und Gülledüngung 2011 und 2012 lag eine durchschnittliche Niederschlagsmenge vor. Insgesamt war es in der Vegetationsperiode 2011 nasser und kälter als ein Jahr später. So wurden 2011 269 Wachstumstage, 2012 aber 300 Wachstumstage gezählt

Der Mai 2011, somit die ersten Wochen nach Pflanzung, war relativ trocken, so dass viel bewässert werden musste. Die Bewässerung wurde mit einem Gartenschlauch von Hand durchgeführt, möglicherweise glich diese kurze aber starke Bewässerung einem Starkregen. Dieser führte unter Umständen zur Auswaschung von Antibiotika in tiefere Bodenschichten, die für Pflanzenwurzeln nicht mehr erreichbar waren. Für CTC beschrieb Stevens (2009) bereits dessen Verlagerung in tiefere Schichten von Bodensäulen nach Simulation eines Starkregens [196].

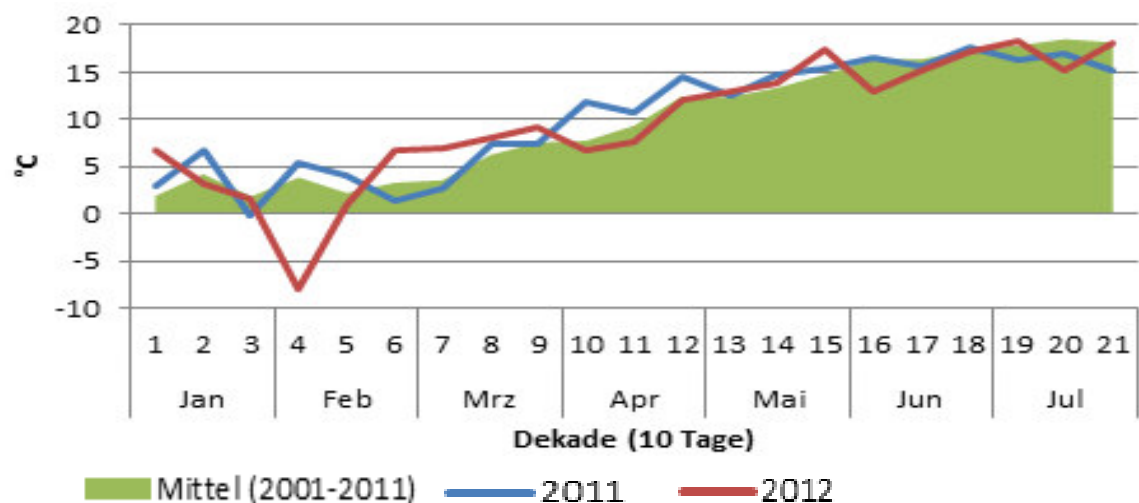




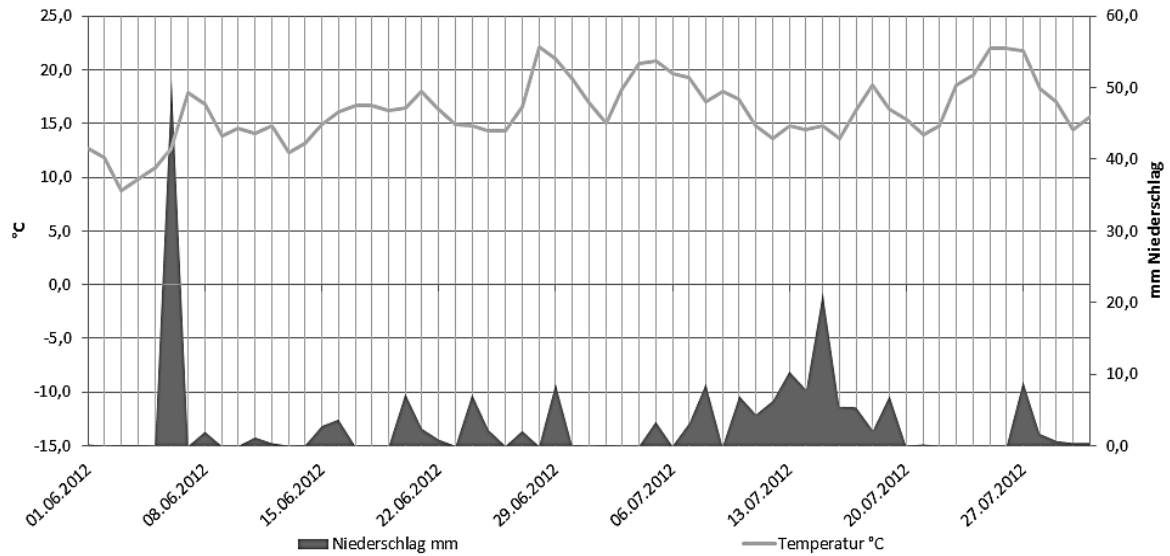
**Abbildung 10: Niederschlagsverteilung von Januar bis Juli der Jahre 2011 und 2012 im Vergleich zum zehnjährigen Mittel**

**Tabelle 12: Auflistung verschiedener Jahreskennwerte für die Anbauperiode 2011 bis 2012**

	01.09.2010 bis 31.08.2011	01.09.2011 bis 31.08.2012
<b>Temperatursumme (&gt;5°C)</b>	3501	3793
<b>Anzahl der Wachstumsstage</b>	269	300
<b>Jahresniederschlag</b>	733	585
<b>Jahresdurchschnittstemperatur</b>	9,77	10,5



**Abbildung 11: Temperaturverlauf von Januar bis Juli der Jahre 2011 und 2012 im Vergleich zum zehnjährigen Mittel**

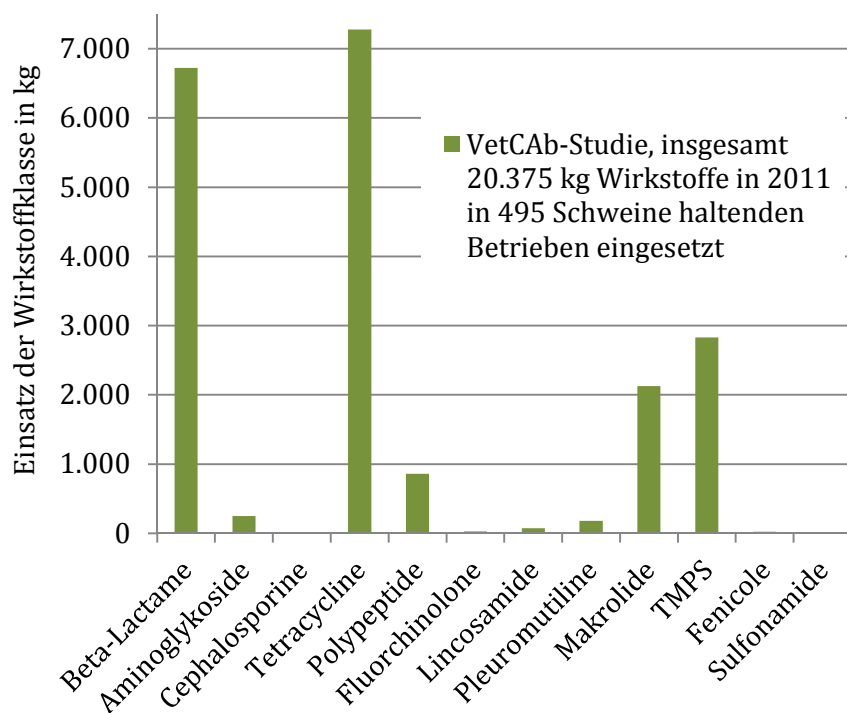


**Abbildung 12: Darstellung der Temperatur- und Niederschlagsverteilung vom 01.06.2012 bis 31.08.2012**

.....  
Die Wetterdaten wurden vom Versuchsgut Merklingsen aufgezeichnet und ausgewertet und die Grafiken für das Projekt zur Verfügung gestellt

## 5.2 Verfahrensweise zur Anbauperiode 2011

Im Feldversuch wurde die Aufnahme von Antibiotika in Gemüsepflanzen unter praxisnahen Expositionsbedingungen untersucht. Die definierte Dotierung der als Dünger eingesetzten Tierexkremente ermöglichte kontrollierte Aufnahmebedingungen. Fluorchinolone gehören zu den Reserveantibiotika (CIA), die aber im Verbrauch der Veterinärmediziner ansteigen, so wurde ENR als Beispiel dotiert. Aufgrund der bedrohlichen Ausbreitung von Resistenzen, insbesondere gegen  $\beta$ -Lactame, wurde AMO für die Dotierung der Tierexkremente ausgewählt.  $\beta$ -Lactame sind neben den Tetracyclinen die meist eingesetzten Antibiotika in der Tierhaltung (siehe Abbildung 13). Ein weiterer Grund für die Dotierung mit TC ist seine Persistenz. Tetracycline sind noch Monate bis Jahre nach der Gabe im Stallstaub oder im Schweineknöchel nachweisbar [241–243]. Zudem wurden Tetracycline bereits in der Stallumgebung und auch im Grundwasser nachgewiesen [241, 244]. Durch die Langlebigkeit der Tetracycline kann es zur Akkumulation der Rückstände kommen und somit zur erhöhten Exposition in der Umwelt oder was zu prüfen war, zur erhöhten Aufnahme in die Pflanze.



**Abbildung 13: Wirkstoffverteilung in Schweinebetrieben der VetCAB-Studie [245]**

Das Versuchsfeld (Versuchsgut Merklingsen der FH Südwestfalen, Soest), auf dem die Versuchspartzen angelegt wurden, war seit 10 Jahren nicht mehr organisch gedüngt worden, d.h. seit mindestens 10 Jahren hatte kein Antibiotikaeintrag stattgefunden. Bei dem Boden handelte es sich um einen sandigen Leimboden mit einem Schluffanteil von über 70% und einem geringen Humusgehalt von unter 2% in der Soester Börde [196].

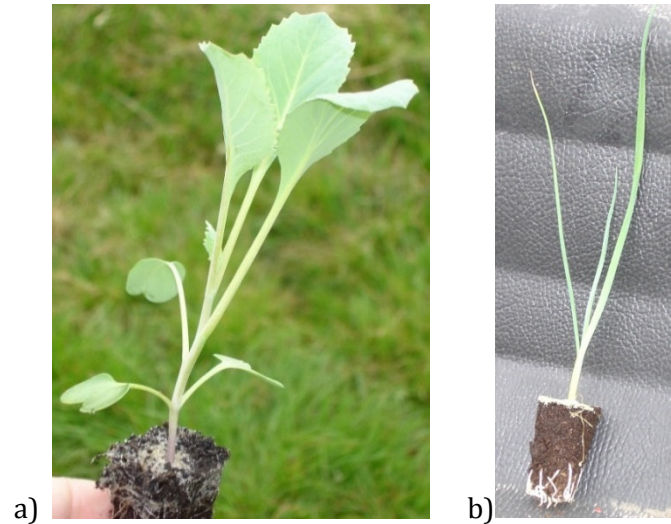
Der Feldversuch bestand aus 16 verschiedenen Varianten, die in Tabelle 13 aufgelistet sind.

**Tabelle 13: Verschiedene Varianten im Feldversuch 2011**

Variante	Pflanze	Tierexkrement	Antibiotikum
1	Porree	Schweinegülle	AMO
2			TC
3			ENR
4			oD (ohne Dotierung; Kontrolle)
5		Hühnerkot	AMO
6			TC
7			ENR
8			oD
9	Weißkohl	Schweinegülle	AMO
10			TC
11			ENR
12			oD
13		Hühnerkot	AMO
14			TC
15			ENR
16			oD

## Pflanzung

Das Feld wurde von Mitarbeitern des Versuchsguts für die Pflanzung vorbereitet, indem 12 cm tief gefräst wurde. Diese Arbeiten erfolgten einen Tag vor der Pflanzung bzw. am Morgen des Pflanzungstages. Die Parzellen wurden mit Porree oder Weißkohl bepflanzt (siehe Abbildung 14 und Abbildung 15).



**Abbildung 14: Jungpflanzen (Setzlinge) zum Zeitpunkt der Pflanzung**  
a) Weißkohl b) Porree

Weißkohl: Parzellengröße 3 x 6 m

AMO - S	TC - S	oD - S	ENR - S	AMO - G	TC - G	oD - G	ENR - G
AMO - S	TC - S	oD - S	ENR - S	AMO - G	TC - G	oD - G	ENR - G

a) Porree: Parzellengröße 3 x 4,5 m



**Abbildung 15: a) Anbauplan b) Bepflanztes Versuchsfeld am 12.05.2011**

Foto: I. Michels, wenn nicht anders vermerkt, stammen die Fotografien von I. Michels

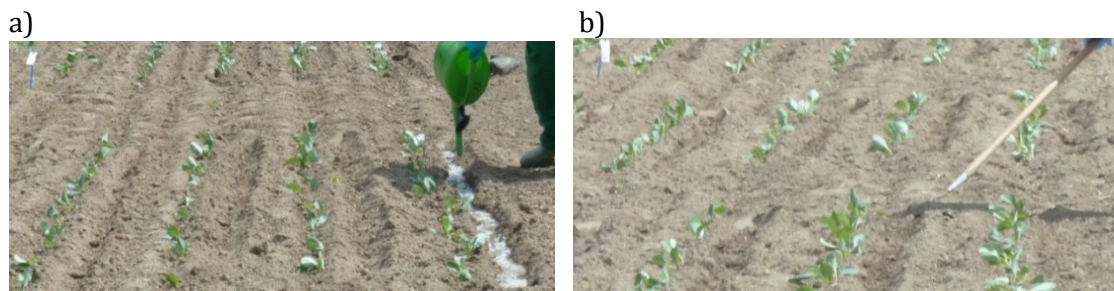
## Düngung 2011

Das Feld wurde in Parzellen (2 Reihen mit je 8 Parzellen) eingeteilt (siehe Abbildung 15a). Eine Parzellenreihe wurde mit Porree bepflanzt, die andere mit Weißkohl. Zwei Wochen nach Pflanzung wurden die jeweils vorderen vier Parzellen mit Schweinegülle (SG) gedüngt, die hinteren mit Hühnerkot (GK). Anteile der Tierexkremente wurden jeweils separat mit AMO, TC oder ENR dotiert und für die Anzucht von Kontrollpflanzen jeweils einmal nicht dotiert (oD). Für die mikrobiologischen Untersuchungen wurde ein ESBL-produzierender und Fluorchinolon-resistenter *E. coli*-Stamm in einer Konzentration von  $10^3$  koloniebildenden Einheiten (KbE) pro mL den Tierexkrementen zugesetzt. Für die Kontrollparzelle wurden der undotierten Schweinegülle ESBL/PMQR-*E. coli* zugesetzt, dem Hühnerkot nicht.

Die benötigte antibiotikafreie Schweinegülle (aus Stoffwechselkäfigen) wurde vom „Johann Heinrich von Thünen Institut“ in Braunschweig zur Verfügung gestellt. Der Transport erfolgte in einem 1000 L Kunststofftank (IBC-Behälter). Der Stickstoffgehalt der Schweinegülle betrug laut LUFA-NRW-Prüfbericht 0,15% (FG) bzw.  $1,5 \text{ kg/m}^3$  (Trockenmasse).

Der antibiotikafreie Hühnertrockenkot stammte vom „Friedrich Löffler Institut für Tierernährung in Mariensee“. Der Transport erfolgte in 90 L Kunststoffwannen. Der verdünnte Hühnerkot hatte nach der Nährstoffuntersuchung durch die LUFA-NRW einen Stickstoffgehalt von 0,5% (FG) bzw.  $4,9 \text{ kg/m}^3$  (Trockenmasse).

Die Konzentration der Antibiotika betrug  $150 \text{ mg/m}^2$  Boden, in Anlehnung an die im Arbeitskreis durchgeführte Feldstudie über die Aufnahme von Antibiotika in Rotkohl [21]. Es wurden  $2 \text{ L/m}^2$  Schweinegülle aufgetragen und  $3,6 \text{ L/m}^2$  Hühnerkot ( $0,655 \text{ kg/m}^2$ ). Die Gülle konnte bei einem Trockensubstanzanteil von 2,3% (w/w) direkt auf das Feld aufgebracht werden. Der Hühnerkot wurde auf 5% (w/w) Trockensubstanz mit Wasser verdünnt, somit ergab sich hier eine Antibiotikakonzentration von  $42 \text{ mg/L}$ . Die Antibiotikadotierung und die Bakterien-Zugabe erfolgten jeweils in der Gießkanne. Es wurde etwas Gülle vorgelegt, die zuvor gelösten Antibiotika und die Bakteriensuspension dazugegeben und mit Gülle aufgefüllt. Die Mischungen pro Gießkanne sind im Anhang (Tabelle 37 S.161) angegeben.



**Abbildung 16: Düngung der Pflanzen 2011 (Foto: M. Grote): a) Aufbringen der Tierexkimente mit der Gießkanne in einer zuvor angelegten Rille; b) Abdecken der Rille mit Bodenerde**

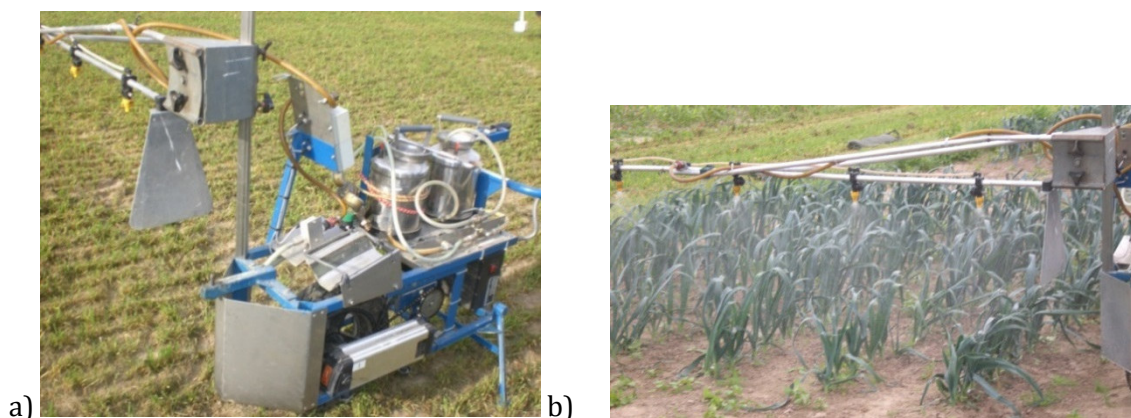


Da der Stickstoffgehalt der Schweinegülle mit 0,15% sehr gering war, wurde ein weiteres Mal mit 9 L pro Parzelle undotierter Schweinegülle am 21.06.2011 gedüngt. Die Weißkohl-pflanzen waren schon sehr groß gewachsen, so dass ausschließlich der Porree nochmals or-ganisch gedüngt wurde. Hierzu wurden wieder Güllerinnen gezogen.

Eine weitere Düngung erfolgte mineralisch mit 350 kg/ha Kalkammonsalpeter (27%) für alle Parzellen am 20.07.2011.

### *Pflanzenschutz 2011*

Nach der Pflanzung wurde über die gesamte Fläche ein Kohlnetz gespannt, um Schädlings-befall zu vermeiden. Trotz des Netzes wiesen die Pflanzen erheblichen Schädlingsbefall auf. Um Ernteverluste zu vermeiden, wurden die Pflanzen mit dem Fungizid „Signum“ 1,5 kg/ha, den Insektiziden „Mospilan“ 0,25 kg/ha und „Plenum“ 0,4 kg/ha behandelt. Dazu wurden 220 L Wasseraufwandmenge mit einer Parzellenspritze, die in Eigenbau vom Versuchsgut Merklingsen konstruiert worden war (siehe Abbildung 17), versprüht. Die Behandlung er-folgte zweimal, jeweils am 7. und am 20. 07. 2011.



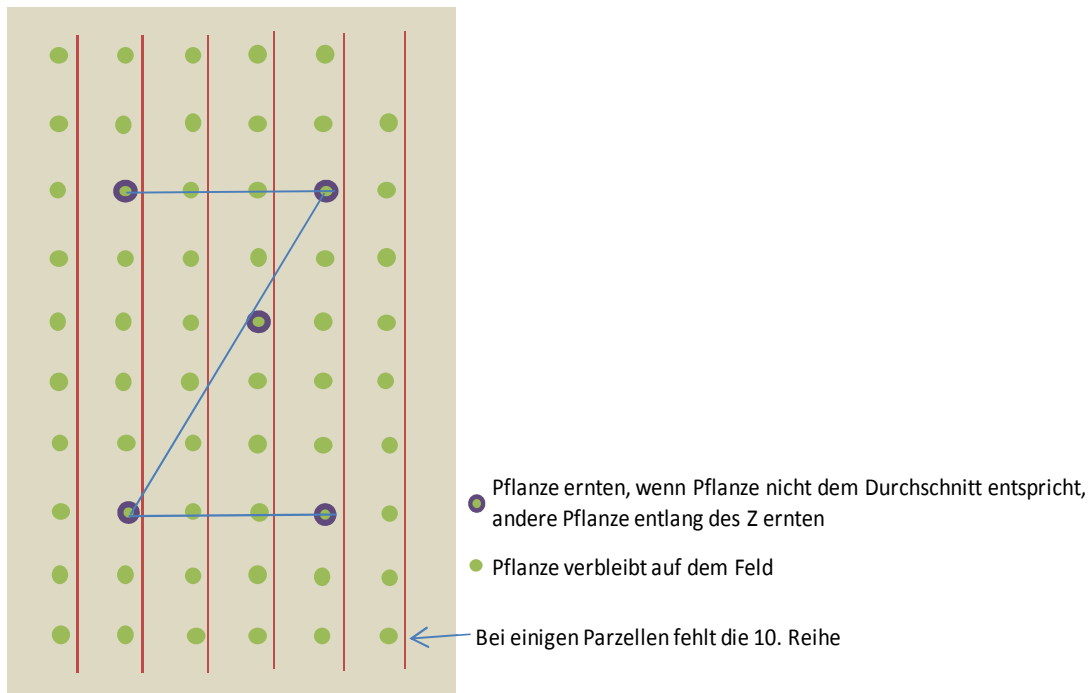
**Abbildung 17: a) Parzellenspritze b) Auftrag von Pflanzenschutzmittel**

### *Pflanzenprobennahme 2011*

Am 14.09.2011 wurden die Pflanzen geerntet. Die Ernte der ganzen Pflanzen und Wurzeln erfolgte von Hand: Die Porreepflanzen konnten mit Wurzel aus der Erde gezogen werden. Bei der Weißkohlpflanze wurde zunächst der oberirdische Teil geerntet: Mit einem Spaten wurde die Weißkohlpflanze von der Wurzel abgestochen. Anschließend wurden drei bis fünf äußere Blätter und ein Viertel des Weißkohlkopfes für die rückstandsanalytischen Untersu-chungen separiert. Danach wurde die Weißkohlwurzel ausgegraben und ebenfalls für die

rückstandsanalytischen Untersuchungen verwendet. Abbildung 19 und Abbildung 18 zeigen das Ernteschema in Form eines „Z“. Die Form des Z's ermöglicht eine repräsentative Probennahme einiger weniger Pflanzen für die gesamte Parzelle.

Pro Variante wurden fünf Weißkohlpflanzen bzw. zehn Porreepflanzen entnommen. Es wurden Pflanzen mittlerer Größe gewählt. Bei den Parzellen ohne Dotierung wurden zusätzlich zehn Porreewurzeln bzw. fünf Weißkohlwurzeln geerntet, um die Erntemenge zu erhöhen.



**Abbildung 18: Ernteschema Weißkohl**





dunkelgrünen großen Kohlblättern verwendet (siehe Abbildung 21). Der Strunk wurde verworfen.

Alle Pflanzenteile wurden gründlich gewaschen, anschließend in ca. 2x2 cm große Stücke geschnitten und bei -30 °C bzw. -60 °C in der Gefriertruhe für die nachfolgende Rückstandsanalytik gelagert.



**Abbildung 20: Teilung der Porreepflanzen in alte und junge Blattabschnitte, sowie Wurzel**



**Abbildung 21: Teilung der Weißkohlpflanze in Kopf und äußere Blätter**

### *Pflanzenwachstum*

Sowohl Porree als auch Weißkohl waren zum Zeitpunkt der Ernte sehr gut gewachsen (siehe Abbildung 24). Bedingt durch einen sehr trockenen Frühsommer war alle zwei Tage gewässert worden. In den ersten drei Monaten der Wachstumsphase wurde regelmäßig Unkraut gejätet.

Zur einheitlichen Codierung der Entwicklungsstadien von Pflanzen dient die BBCH-Skala. Sie ist eine Gemeinschaftsarbeit der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA), des Bundessortenamtes (BSA), des Industrieverbandes Agrar (IVA) und des

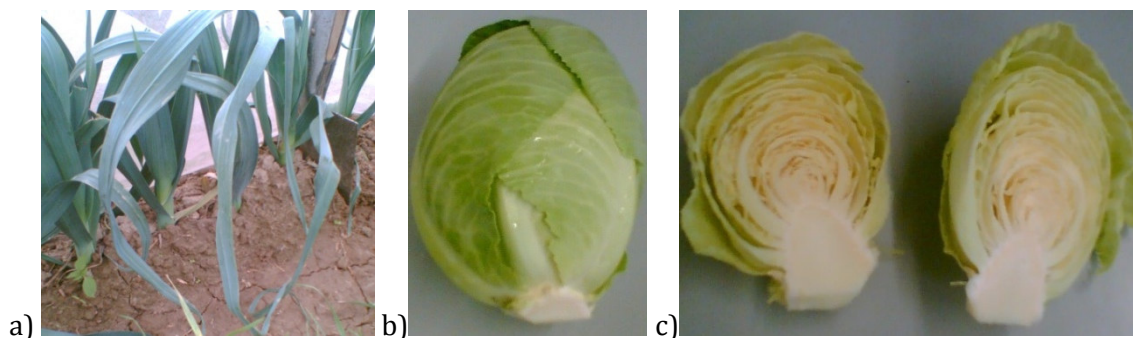
Instituts für Gemüse und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt. Die Skala ist angelehnt an die von Zadoks *et al.* (1974) [246] entwickelte Getreideskala. Die Kurzbezeichnung BBCH leitet sich ab von **B**iologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, **B**undessortenamt und **C**hemische Industrie [247].

Abbildung 22 zeigt den Kohl und Porree nach zweimonatiger Wachstumsphase. Es ist zu erkennen, dass die Kopfbildung zu diesem Zeitpunkt einsetzte (BBCH-Codierung 41). Zwei Wochen später waren kleine Kohlköpfe mit einem Durchmesser von ca. 10 cm zu erkennen (BBCH-Codierung 42, Abbildung 23). Das Gewicht eines Kohlkopfes betrug 80 bis 300 g. Die Porreestangen wiesen zu diesem Zeitpunkt einen Durchmesser von ca. 2 cm auf und waren etwa einen halben Meter hoch gewachsen (BBCH-Codierung 43).

Nach vier Monaten Vegetationszeit wurden die Pflanzen geerntet. Die Porreepflanzen waren ca. 1,20 m hoch gewachsen, der Stangendurchmesser betrug ca. 5 cm (BBCH-Codierung 49). Der Weißkohlkopf erreichte ein Gewicht von 2 - 3 kg, mit einem Durchmesser von ca. 22 cm (BBCH-Codierung 49). Abbildung 24 zeigt eine Porree- sowie Weißkohlpflanze zum Zeitpunkt der Ernte.



**Abbildung 22: Pflanzenwachstum acht Wochen nach Pflanzung: a) Porree b) Weißkohl c) Beginnende Kopfbildung des Weißkohls (Foto vom 7.7.2011)**



**Abbildung 23: Pflanzen im Juli, in der Hälfte der Wachstumszeit (20.07.2011, zehn Wochen nach Pflanzung)**

a)



b)



**Abbildung 24: Erntereife Pflanzen: a) Porree b) Weißkohl (Fotos: M. Grote)**

a)



b)



**Abbildung 25: a) Probennahme: beerntete Porreeparzelle b) beerntete Weißkohlparzelle**

Zehn Porreepflanzen und fünf Weißkohlpflanzen wurden in einer Z-Konfiguration der Parzelle entnommen. (Fotos M. Grote)

### 5.2.1 Methodenentwicklung zur Bestimmung der Antibiotikagehalte in Pflanzen und Boden

#### *Analyse von Antibiotikagehalten*

Im Projekt wurden verschiedene Proben genommen und auf extrahierbare Rückstände von ENR, TC, AMO und deren Hauptumwandlungsprodukten CIP, eTC, AMA und Diketo untersucht. Beprobte wurden die dotierten Tierexkremente, der Boden und die Pflanzen (Wurzel, junge und alte Blätter) des Feldversuchs. Die angewendeten analytischen Methoden waren Fest-Flüssig-Extraktion unterstützt durch Ultraschall, Festphasenextraktion und LC-MS/MS-Detektion. Zum Teil waren die Methoden bereits beschrieben, mussten aber an die vorliegenden Bedingungen angepasst werden:

- Für ENR und TC in Weißkohl und Porree aus Hydrokultur [17, 248]
- Für AMO aus dem Extraktionsmittel [240]
- Für ENR, CTC in Rotkohl eines Feldversuchs [21, 240]
- Für ENR im Boden [21] und TC im Boden [10, 196]
- Für ENR und TC in Schweinegülle [249]

Eine detaillierte Methodenbeschreibung mit Validierungsdaten ist im Anhang (Kapitel B S. 163) nachzulesen.

Mittels  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (pH 2) und einer HLB-Kartusche konnten Wiederfindungen im Weißkohlkopf an ENR von etwa 40%, an TC von ca. 30% und AMO ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  FG mit 30% bestimmt werden. Im Porree konnten Wiederfindungen von 100% für ENR und von 60% für TC erreicht werden. Für AMO ließ die Methode nur qualitative Ergebnisse zu, da sich die Peaks im MS-Chromatogramm nicht ausreichend vom Rauschen abheben. Der Fokus lag auf dem jeweils essbaren Teil des Gemüses.



## 5.2.2 Ergebnisse der Rückstandsanalysen der Anbauperiode 2011

### *Antibiotika in der Pflanze*

In Tabelle 14 und Tabelle 15 sind die Ergebnisse der Analyse auf Antibiotikarückstände in Porree und Weißkohl gezeigt.

**Tabelle 14: Ergebnisse der Analyse von Porree und Weißkohl, Ernte 2011, Schweinegülle**

150 mg/m<sup>2</sup> Dotierung im Boden, 10 g Einwaage Homogenat; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Extraktant, externe Kalibrierung, N=2, n=3, Ergebnisse in µg/kg FG Homogenat, n.n.=nicht nachgewiesen, BG=Bestimmungsgrenze

Probe		do- tiert	AMO	AMA	Diketo	ENR	CIP	TC
Porree	junge Blattab- schnitte (essbarer Teil)	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	<BG	n.n.	n.n.
		TC	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	5,2 +/- 0,2
	alte Blattab- schnitte	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		TC	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	Wurzel	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		TC	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Weiß- kohl	Kopf (essbarer Teil)	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	0,3 +/- 0,02	n.n.	n.n.
		TC	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	alte Blätter	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		TC	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	Wurzel	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		TC	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

**Tabelle 15: Ergebnisse der Analyse von Porree und Weißkohl, Ernte 2011, Hühnerkot**

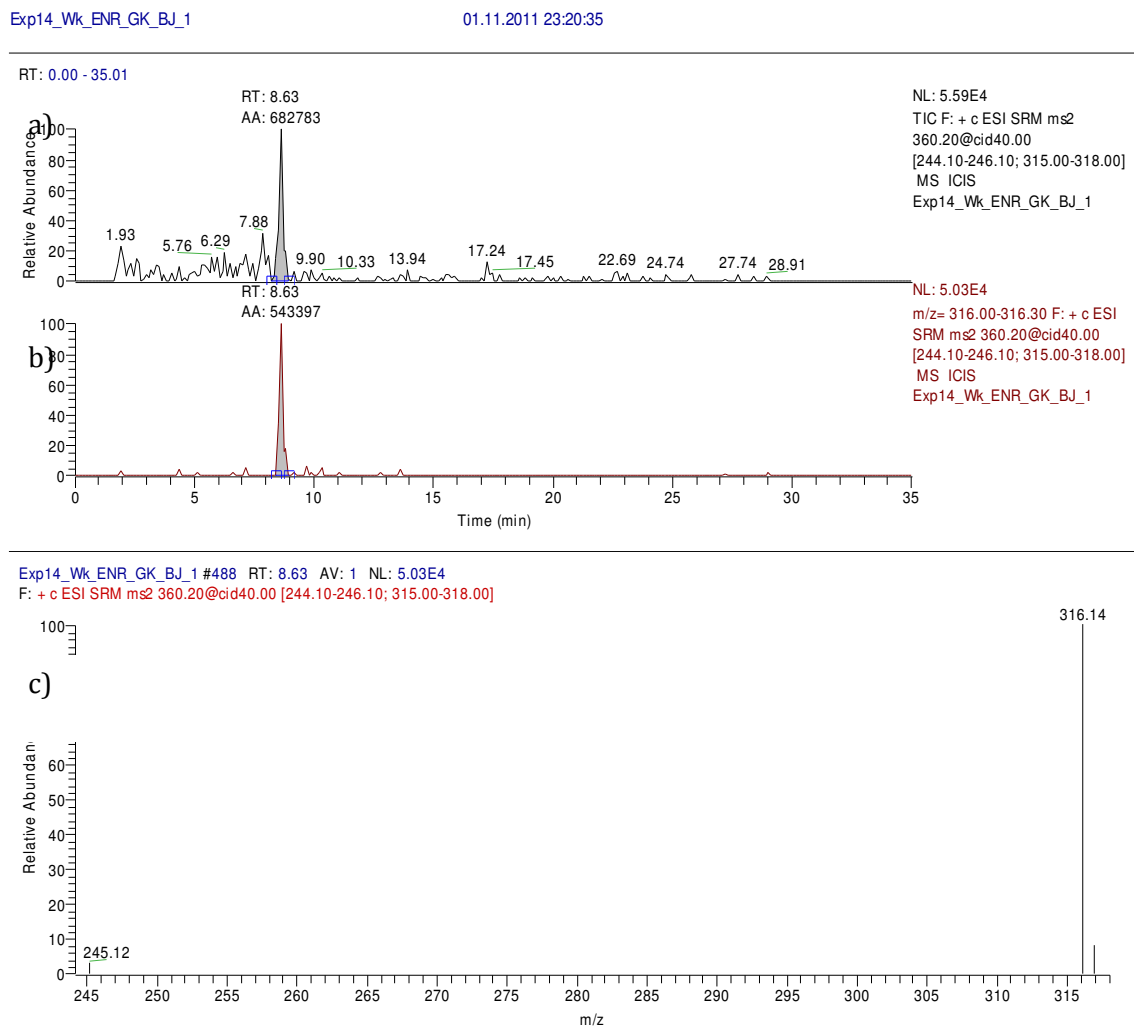
150 mg/m<sup>2</sup> Dotierung im Boden, 10 g Einwaage Homogenat; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Extraktant, externe Kalibrierung, N=2, n=3, Ergebnisse in µg/kg FG Homogenat, n.n.=nicht nachgewiesen

Probe		do-tiert	AMO	AMA	Dik-eto	ENR	CIP	TC
Porree	junge Blattabschnitte (essbarer Teil)	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	<b>0,2 +/- 0,1</b>	n.n.	n.n.
		TC	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	<b>5,0 +/- 0,2</b>
	alte Blattabschnitte	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		TC	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	Wurzel	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		TC	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Weißkohl	Kopf (essbarer Teil)	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	<b>0,3 +/- 0,1</b>	n.n.	n.n.
		TC	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	äußere Blätter	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	<b>0,3 +/- 0,1</b>	n.n.	n.n.
		TC	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	Wurzel	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		TC	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

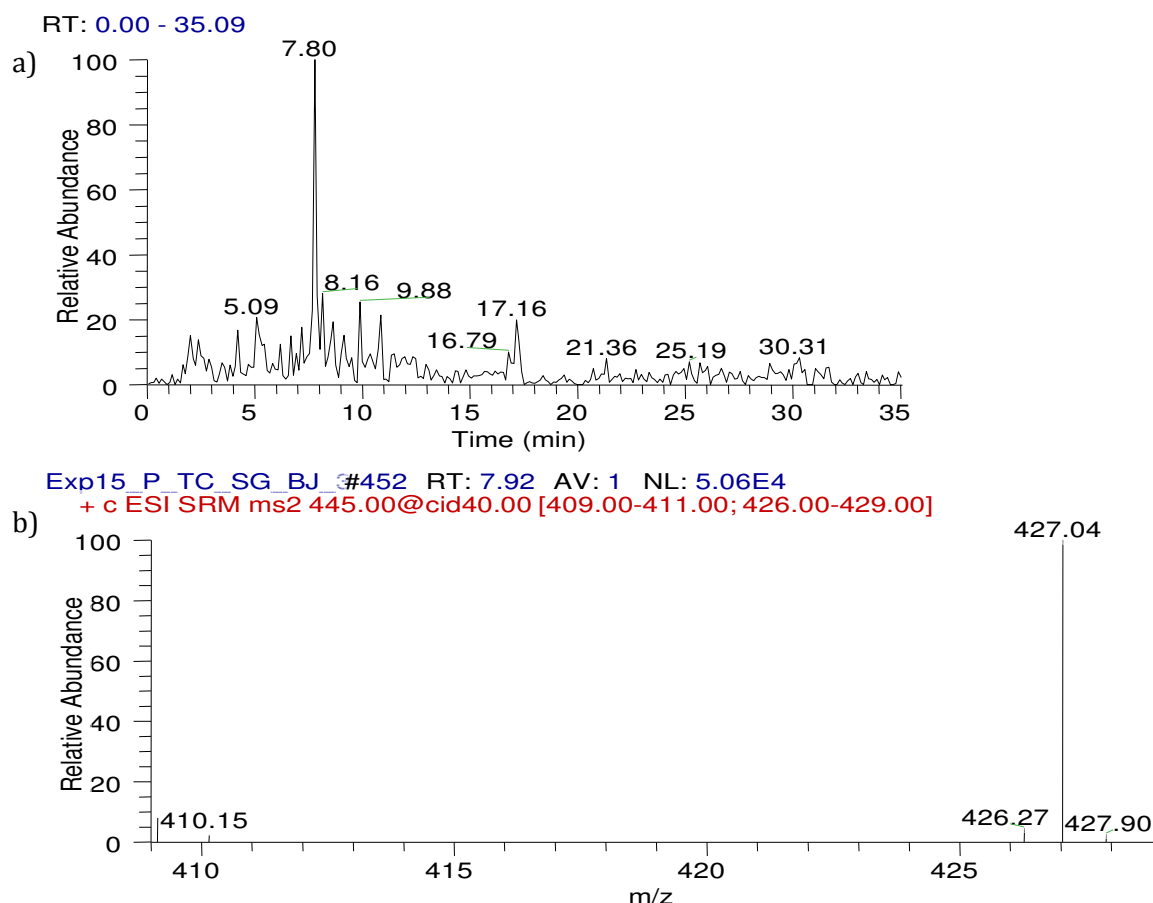
Die Analysen (siehe Tabelle 14 und Tabelle 15) des Weißkohlkopfes zeigten Rückstände für ENR von 0,3 µg/kg FG jeweils von Parzellen, die mit ENR-dotierter Schweinegülle bzw. Hühnerkot gedüngt worden waren. In der „Hühnerkotparzelle“ war auch in den äußeren Blättern des Weißkohls ein Gehalt von 0,3 µg/kg FG nachweisbar. In den jungen Blättern vom Porree konnte in der „Hühnerkotparzelle“ 0,2 µg/kg FG ENR bestimmt werden. Die jungen Blätter des Porrees, Düngung durch Schweinegülle, wiesen Gehalte an der Nachweisgrenze auf. Gehalte für TC konnten in den jungen Blattabschnitten von 5,2 µg/kg FG bzw. 5,0 µg/kg FG der entsprechenden Porreeparzellen gemessen werden. Im Weißkohlkopf, der auf TC-dotiert gedüngten Feldern gewachsen war, konnten keine Rückstände nachgewiesen werden.

den. Auch von AMO wurden in den entsprechend gedüngten Pflanzen keine Rückstände gefunden. Die Pflanzen, die mit undotierten Tierexkrementen gedüngt wurden, zeigten keine Antibiotikarückstände.

In Abbildung 26 und Abbildung 27 sind ausgewählte Chromatogramme und Massenspektren zu den Positivbefunden abgebildet.



**Abbildung 26: a) SRM-Chromatogramm mit positivem ENR-Befund im Weißkohlkopf (aus Hühnerkot gedüngter Parzelle); b) Chromatogramm wie in a) und m/z gefiltert nach 316,0 bis 316,3; c) Fragmentspektrum für ENR des Chromatogramms aus a)**



**Abbildung 27: a) SRM-Chromatogramm mit positivem TC-Befund im Porree (aus Schweinegülle gedüngter Parzelle) b) zugehöriges Fragmentspektrum**

Abbildung 26 zeigt Massenchromatogramme und Fragmentspektrum des ENR-Befunds im Weißkohlkopf. Für die ENR-Untersuchungen wurden Molekül-Ionen mit  $m/z$  von 359,2 bis 361,2 aufgenommen. Bei positivem Befund wurde ein Peak bei  $t_R$  8,50 min erwartet. Das SRM-Chromatogramm in Abbildung 26a zeigt einen deutlichen Peak bei einer Retentionszeit von 8,63 min. Diese Retentionszeit weicht um 1,5% zum Standardwert ab, das ist innerhalb der Toleranzgrenze von 5%. In der EU-Richtlinie 96/23/EG werden zur Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen Mindestanforderung zur Identifizierung von Stoffen mittels Massenspektrometrie festgelegt. Neben der Übereinstimmung der Retentionszeit müssen ein Vorläufer-Ion und zwei dazugehörige Produkt-Ionen aufgezeichnet werden [250]. Abbildung 26b zeigt das SRM-Chromatogramm aus Abbildung 26a nachdem nach der intensivsten Fragmentmasse von ENR ( $m/z$  316,2) gefiltert wurde. Es werden jetzt ausschließlich die Intensitäten der Massen im SRM-Chromatogramm ange-



zeigt, die im zugehörigen MS/MS-Spektren eine Masse mit  $m/z$  316,0 bis  $m/z$  316,3 aufweisen. Das Signal zu Rausch-Verhältnis des ENR-Peaks wird dadurch deutlich verbessert (von  $S/N$  10/1 auf  $S/N$  100/1). Zur weiteren Identifizierung von ENR wurden nach den MS/MS-Stoßereignissen die Fragmentmassen  $m/z$  245,1 und 316,2 aufgezeichnet.

Abbildung 26c zeigt das Fragmentspektrum, welches zum SRM-Chromatogramm aus Abbildung 26a gehört. Das Spektrum zeigt einen Peak mit  $m/z$  316,14, dem Hauptfragment (100% Intensität) von ENR und einen deutlich schwächeren Peak bei  $m/z$  245,12, dem schwach messbaren Fragment (5% Intensität) von ENR. Somit sind alle Bedingungen nach der oben genannten EU-Richtlinie erfüllt.

Ein weiteres Beispiel für einen positiven Befund zeigt Abbildung 27 mit einem SRM-Chromatogramm und dem zugehörigen Fragmentspektrum von TC im Porree. Auch hier sind die Kriterien, <5% Abweichung der Retentionszeit zu der des Standard und Identifizierung mit Vorläufer-Ion und zwei Produkt-Ionen, erfüllt.

### *Antibiotika im Boden*

Die Untersuchung des Bodens (siehe Tabelle 16) des Versuchsfeldes vor der Pflanzung ergab keine Antibiotikarückstände. Nach der Gülledüngung wurden die folgenden extrahierbaren Gehalte nachgewiesen:

Der ENR-dotiert-gedüngte Boden der Porree- und der Weißkohlparzellen wies zwei Wochen nach der Düngung Rückstände von ENR unterhalb der Bestimmungsgrenze auf (NWG 1  $\mu\text{g/kg FG}$ , BG 5  $\mu\text{g/kg FG}$ ). Zum Zeitpunkt der Ernte wurden ENR-Rückstände in Höhe von 10,0 und 9,5  $\mu\text{g/kg FG}$  für die Weißkohlparzellen, sowie 15,4 und 14,7  $\mu\text{g/kg FG}$  für die Porreeparzellen gemessen. Dass die Befunde im Boden zum Zeitpunkt der Düngung niedriger sind als zur Ernte, scheint widersinnig, ist aber durch die Rillenbegüllung möglicherweise erklärbar. Die Bodenproben wurden jeweils in der Mitte zwischen zwei Rillen entnommen, es dauerte somit einige Zeit, bis sich die Inhaltsstoffe der Gülle, somit auch die dotierten Antibiotika über die Parzelle verteilten.

Das Umwandlungsprodukt Ciprofloxacin wurde nicht nachgewiesen, da nur Peaks mit einem *normalization level* (Maß für die Intensität des Messsignals) von mindestens  $10^4$  als positiv bewertet wurden.

Im Boden der Porreeparzelle mit TC-dotierten Tierexkrementen wurden zwei Wochen nach der Düngung und auch zum Zeitpunkt der Ernte TC detektiert. Nach Quantifizierung lagen die Werte jedoch unterhalb der bestimmten NWG, so dass es sich hier möglicherweise um falsch positive TC-Befunde handelt. Ähnliches wurde bereits bei Getreideuntersuchungen im Arbeitskreis beobachtet: Nach Überprüfung mittels hochauflösender Massenspektrometrie wurden einige TC-Befunde falsifiziert [13, 248].

AMO, AMA, Diketo konnten in keiner Parzelle im Boden detektiert werden.

**Tabelle 16: Extrahierbare Antibiotika und Umwandlungsprodukte im Boden 2011**

150 mg/kg Dotierung im Boden, Bodenfraktion < 0,5 mm, 5 g Einwaage,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ -Extraktant, externe Kalibrierung, N=2, n=3, n.n.=nicht nachgewiesen, NWG=Nachweisgrenze, BG=Bestimmungsgrenze

Bodenprobe	Parzelle	extrahierbares Gehalt [ $\mu\text{g/kg FG}$ ]		
		Antibiotikum	Umwandlungsprodukt	Antibiotikum + Epimer
		Dotiert: ENR	CIP	TC + eTC
vor der Düngung	ganzes Feld	n.n.	n.n.	n.n.
2 Wochen nach Düngung	Porree, Schweinegülle	< NWG	n.n.	< NWG
	Porree, Hühnerkot	< NWG	n.n.	< NWG
	Weißkohl, Schweinegülle	< BG	n.n.	n.n.
	Weißkohl, Hühnerkot	< BG	n.n.	n.n.
zum Zeitpunkt der Ernte	Porree, Schweinegülle	15,4 +/- 4,3	n.n.	< NWG
	Porree, Hühnerkot	14,7 +/- 3,3	n.n.	< NWG
	Weißkohl, Schweinegülle	10,0 +/- 4,3	n.n.	n.n.
	Weißkohl, Hühnerkot	9,5 +/- 4,3	n.n.	n.n.

### 5.2.3 Mikrobiologische Untersuchungen 2011

Die mikrobiologischen Untersuchungen wurden an der FU Berlin im Institut für Tier- und Umwelthygiene von Prof. Dr. Uwe Rösler durchgeführt.

Die Probennahme erfolgte in gleicher Weise wie für die Rückstandsanalytik: Pro Parzelle wurden fünf Pflanzen geerntet. Wurzel und Blätter wurden getrennt und mikrobiologisch analysiert. Auf die Analyse der äußeren Blätter wurde verzichtet. Die Pflanzenteile wurden in einem Stomacher-Homogenisator zerkleinert. Die Homogenisierung erfolgte im sterilen

Plastikbeutel, so kam die Probe nicht mit dem Gerät in Berührung und die Verarbeitung erfolgte hygienisch und ohne Infektionsrisiko. Zudem führt diese Art der Zerkleinerung zu sehr guten Wiederfindungsraten von Mikroorganismen. Die Pflanzen wurden im LB-Medium (*lysogeny broth*: Hefeextrakt, Trypton, NaCl) zerkleinert. Das Pflanzen-Medium-Gemisch wurde bei 37 °C für 24 h inkubiert, so dass vorhandene Mikroorganismen sich vermehren. Von dieser Suspension wurden 100 µL auf ein Selektivmedium ausplattiert. Als Selektivmedien wurden MacConkey-Agar mit Cefotaxim und Endo-Agar mit ENR verwendet. Bei beiden Medien wachsen bevorzugt gramnegative Bakterien, wie *E. coli*, das Wachstum grampositiver Bakterien wird unterdrückt. Dem MacConkey-Agar war das  $\beta$ -Lactam Cefotaxim zugesetzt worden, so dass nur ESBL-produzierende Bakterien wuchsen. Dem Endo-Agar wurde ENR zugesetzt, hier konnten nur Bakterien mit einer Fluorchinolonresistenz wachsen.

Untersucht wurde auch der Boden und vor der Bepflanzung die Setzlinge, die anhaftende Erde der Setzlinge, die in kleinen Erdblöcken angeliefert worden waren, und die undotierten Tierexkrementen. Für die Analyse des Bodens wurde dieser für 30 min in LB-Medium geschüttelt. Die weitere Vorgehensweise entsprach der für die Pflanzen.

Die Bestätigung und Charakterisierung der auf den Selektivmedien gewachsenen Bakterienkolonien erfolgte mittels MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) und PCR. Für jede Probe wurde die Spezies einer zufällig ausgewählten identifizierten Verdacht-*E. coli*-Kolonie bestimmt. Weiterhin wurde die Anwesenheit der ESBL-Gene wie bereits bei [251–254] beschrieben oder unter Verwendung von Protokollen, die freundlicherweise vom ESBL SAFEFOODERA Consortium (EU-Projekt SAFEFOODERA 08.176) zur Verfügung gestellt wurden, untersucht. Das Auftreten von ESBL/PMQR wurde durch PCR bestätigt. Die Nukleotidsequenzen wurden mit BioNumerics-Software (Version 6.6) analysiert. Das BLAST-Programm von NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) wurde für den Datenbank-Vergleich verwendet.

Die Ergebnisse zeigen, dass die eingesetzten Tierexkrementen in 2011 frei von ESBL/PMQR-*E. coli* waren. Im Boden vor Begüllung konnte *Pseudomonas*, aber kein *E. coli* nachgewiesen werden, auch nach Begüllung wurden weiterhin keine ESBL-*E. coli* nachgewiesen. Es konnten jedoch Fluorchinolon-resistente *E. coli* und *Alcaligenes faecalis* detektiert werden. Die geernteten Pflanzen enthielten überwiegend *Pseudomonas*, vereinzelt *Acinetobacter* und *Enterobacter*. Der Boden war zur Ernte frei von Fluorchinolon-resistenten Bakterien und bis auf eine Parzelle (Porree, Schweinegülle, ohne Antibiotika, mit ESBL) auch frei von ESBL-produzierenden Bakterien.

Die Untersuchungen auf ESBL-produzierende und Fluorchinolon-resistente *E. coli* ergab positive Befunde bei den beprobten Setzlingen und einen Einzelbefund in Blättern des Weißkohls, der auf einer Parzelle mit ENR dotierter Schweinegülle angebaut worden war. Der Positivbefund bei den Setzlingen war überraschend, andererseits ergänzt es die Ergebnisse des RESET-Projektes, wonach Antibiotikaresistenzen weit verbreiteter sind als angenommen [255].

**Tabelle 17: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen 2011**

Probe		Isolierte Mikroorganismen	
		ESBL-produzierend	Fluorchinolon-resistent
Gülle original			
Setzlinge		<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
Pflanzerde der Setzlinge		<i>Pseudomonas, Achromobacter, Comamonas</i>	
Boden vor Gülledüngung		<i>Pseudomonas</i>	
Boden nach Gülledüngung			<i>E. coli, Alcaligenes faecalis</i>
Ernte (Oktober 2011):	Weißkohl, Porree	vorwiegend <i>Pseudomonas</i>	
	Boden, Parzelle Porree Schweinegülle ohne Antibiotikadotierung-	<i>E. coli, Pseudomonas</i>	

#### 5.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse des Feldversuchs 2011

Die Durchführung des Feldversuchs 2011 verlief insofern erfolgreich als die Porree- und auch die Weißkohlpflanzen sehr gut gewachsen waren: Es standen ausreichend Wachstumstage zur Verfügung. Porree benötigt 120 Entwicklungstage und Weißkohl 120 bis 130 Wachstumstage [256, 257]. Im Jahr 2011 standen insgesamt 269 Wachstumstage zur Verfügung (siehe Tabelle 12, S.65). Des Weiteren konnte kein visueller Unterschied im Wachstum zwischen den Pflanzen der verschiedenen Parzellen, z.B. Düngung mit oder ohne Antibiotikadotierung festgestellt werden. In den ersten drei Monaten wurde aufgrund des eher trockenen Frühsommers viel bewässert. Außerdem wurden außerplanmäßig chemische Pflanzenschutzmittel eingesetzt, da das Kohlnetz keinen ausreichenden Schutz bot.

Akzeptable Wiederfindungen wurden für alle sieben untersuchten Antibiotika und deren Umwandlungsprodukte mit der  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Methode (siehe Anhang Kapitel B.6 S.165) und der Oasis-HLB-Bond-Kartusche (3cc, 60 mg) erhalten. Anhand des Signal-Rausch-Verhältnisses

wurden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für ENR, CIP, TC und eTC im Bereich zwischen 0,1 und 2 µg/kg FG bestimmt. Für AMO, AMA und Diketo wurden NWG und BG zwischen 30 und 200 µg/kg FG erreicht. Für AMO sind NWG und BG in Pflanzenproben vergleichsweise sehr hoch, eine mögliche Ursache könnte am raschen Abbau von AMO liegen. Die Umwandlung zu den noch unbekannten Abbauprodukten würde direkt bei Zugabe zur Matrix erfolgen und wäre dann bereits am Ende der Probenaufbereitung fast abgeschlossen. Chowdhury (2012) [240] testete verschiedene Bedingungen, wie die Wahl des Extraktionsmittels, der SPE-Kartusche, des pH-Wertes während der Extraktion für die Analyse von AMO, AMA und Diketo, konnte jedoch die drei Analyten lediglich aus der Extraktionslösung wiederfinden.

Die Rückstandsanalysen ergaben teilweise positive Befunde, es wurden 5 µg/kg FG TC und bis zu 0,2 µg/kg FG ENR im essbaren Teil des Porrees gefunden und 0,3 µg/kg FG ENR im Weißkohl. Keiner der Positivbefunde konnte bei einer wiederholten Analyse nach 4 Wochen bestätigt werden. Die Instabilität inkorporierter Antibiotika in Pflanzenproben ist bekannt; bei belastetem Getreide hatte es vergleichbare Beobachtungen gegeben [248].

Eine Ursache für die geringen Rückstandsbefunde ist möglicherweise die starke Bewässerung zu Beginn: Die Antibiotika könnten dadurch in tiefere Bodenschichten gespült worden sein, was Stevens [196] für CTC bereits nachgewiesen hat. Auch ist es möglich, dass die Antibiotika sehr stark an die Bodenpartikel gebunden waren und sich diese mit den üblichen, hier auch angewendeten, rückstandsanalytischen Methoden nicht extrahieren ließen. Eine weitere Ursache könnte in der angewandten Düngungsmethode liegen (Ausbringung der Tierexkrement in einer Rille, die neben den Pflanzen verlief, siehe Abbildung 16, S.69). Möglicherweise, war für die Pflanzenwurzeln der gedüngte Bodenbereich nur ungenügend erreichbar, da die Wurzeln nicht bis zur Rille reichten, zumal Weißkohl ein Tiefwurzler [258] und Porree ein Mitteltiefwurzler [259] ist.

Die geringen Rückstandsbefunde an Antibiotika gehen einher mit wenigen Befunden an resistenztragenden Bakterien. Dies könnte dadurch begründet werden, dass Resistenzen sich zurückbilden, sobald der Selektionsdruck der Antibiotika nicht mehr vorhanden ist. Einige Studien zeigen aber, dass dies nicht zwingend der Fall sein muss. Nicht in jedem Fall führt das Tragen einer Resistenz zu schlechteren Überlebensbedingungen von Bakterien, manche resistenztragende Genabschnitte können sogar über die Resistenzeigenschaften hinaus von Vorteil sein, z.B. wird eine erhöhte Toleranz gegenüber Schwermetallen oft gemeinsam mit Resistenzeigenschaften vererbt. [260–262].

### 5.3 Verfahrensweise Anbauperiode 2012

Die Anbauperiode 2012 unterschied sich in Art und Zeitpunkt der Gülleaufbringung, der Auswahl der Tierexkremente und der Parzellengröße von der „2011er“ Durchführung. Gründe für die Änderungen waren:

In Feldversuch der „Rotkohlstudie 2010“ [21, 240] wurde Schweinegülle mit 50 und 150 mg/kg Antibiotika dotiert, und zwar kombiniert ENR und Chlortetracyclin (CTC). Die Gülle wurde Ende Mai vor der Pflanzung flächig mit Gießkannen beaufschlagt und anschließend der Boden gefräst. Noch am selben Tag erfolgte die Pflanzung der Setzlinge. In den Ernteproben wurden zwischen 12 und 16 µg/kg FG an ENR im Rotkohlkopf nachgewiesen, CTC jedoch nicht. Der Feldversuch 2012 der vorliegenden Studie wurde wie der Rotkohlfeldversuch durchgeführt, d.h. die Güllebeaufschlagung und Einarbeitung in den Boden erfolgte vor der Pflanzung der Weißkohl- und Porree-Setzlinge noch am selben Tag. Auf den Einsatz von Hühnerkot wurde verzichtet, da es hier durch die Verwendung von Hühnertrockenkot und der damit verbundenen nötigen Verdünnung mittels Wasser zu Homogenitätsproblemen kommen kann [263]. Darüber hinaus war in der Versuchsperiode 2011 kein Unterschied in der Antibiotikaaufnahme zwischen den mit Hühnerkot und Schweinegülle gedüngten Pflanzen zu erkennen. Außerdem wurde – begründet durch die aktuellen Resistenzlagen und Anwendungsmengen in der landwirtschaftlichen Tierproduktion – auf die Dotierung der Schweinegülle mit TC verzichtet und dafür ein Cephalosporin („Ceftiofur“, CEF) eingesetzt. Subbiah *et al.* (2011) hatten berichtet, dass die antibiotische Aktivität von  $\beta$ -Lactamen in Bodensuspensionen erhalten bleibt, andere Antibiotika aber neutralisiert werden [202]. Somit wurde es als interessant betrachtet, neben AMO ein weiteres  $\beta$ -Lactam für die Untersuchungen zu verwenden. Zudem wurde entschieden, eine Zwischenernte durchzuführen, so dass die Gemüsepflanzen bereits in der Hälfte der Wachstumszeit geerntet wurden.

Die Versuchsvarianten sind in Tabelle 18 aufgelistet, die Parzellenanordnung ist in Abbildung 28 wiedergegeben. Das Versuchsfeld wurde von den Mitarbeitern des Versuchsguts Merklingsen vorbereitet, d.h. das Feld ca. 10 cm tief gefräst, so dass ein tiefes Pflanzbett mit viel Feinerde entstand. Die unbepflanzten Feldbereiche zwischen den Versuchspartzen wurden nach der Pflanzung mit Stroh ausgelegt, somit wurde einem übermäßigen Unkrautwachstum vorgebeugt.

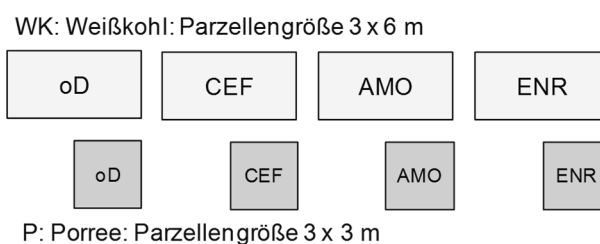
**Tabelle 18: Verschiedene Varianten im Feldversuch 2012**

Alle Parzellen wurden mit Schweinegülle gedüngt, der zuvor eine Resistenz (ESBL, PMQR) produzierende *E. coli*-Suspension in  $10^3$  KbE/mL zugesetzt wurde. Der Antibiotikaeintrag in den Boden betrug  $150 \text{ mg/m}^2$ .

Variante	Pflanze	Antibiotikum
1	Porree	AMO
2		CEF
3		ENR
4		oD
5	Weißkohl	AMO
6		CEF
7		ENR
8		oD

### *Pflanzung 2012*

Es wurden Porree (Speedys, Standardsorte „Septemberernte“) und Weißkohl (Speedys, Kopfkohl „Ancoma“) am 08. Mai 2012 angepflanzt. Pro Variante wurde jeweils eine Parzelle bepflanzt, also vier Parzellen mit Porree und vier Parzellen mit Weißkohl. Zur Vermeidung von Kontaminationen zwischen den Parzellen wurden Einweg-Schuhüberzieher genutzt. Die Parzellenfläche für Porree betrug  $9 \text{ m}^2$  ( $3 \text{ m} \times 3 \text{ m}$ ), für Weißkohl  $18 \text{ m}^2$  ( $3 \text{ m} \times 6 \text{ m}$ ). Der Pflanzabstand für Porree betrug  $10 \text{ cm}$  und für Weißkohl  $60 \text{ cm}$ . Die Pflanzen wurden in Reihen mit einem Abstand von  $50 \text{ cm}$  gepflanzt. Es wurde per Hand gepflanzt, für Porree wurde ein Pflanzstab, wie schon 2011, verwendet. Alle Pflanzen wurden nach der Pflanzung bewässert. Danach erfolgte keine Bewässerung mehr, da es im Frühjahr und Sommer 2012 viel geregnet hatte (siehe Abbildung 12, Seite 66).

**Abbildung 28: Anbauplan 2012**

### *Düngung 2012*

Im Unterschied zum Jahr 2011 erfolgte, wie oben erläutert, die Düngung 2012 am selben Tag wie die Pflanzung. Die Parzellen wurden wieder wie 2011 aus Gießkannen begüllt, anschließend wurde die Gülle aber mit der Harke über die gesamte Parzelle verteilt und in den Boden leicht eingeharkt. Es wurde, wie 2011 mit der praxisüblichen Menge von  $2\text{L}/\text{m}^2$  gedüngt. Erst nach der Düngung erfolgte die Pflanzung, im Jahr zuvor wurde erst zwei Wochen nach Pflanzung gedüngt. Die antibiotikafreie Schweinegülle wurde wie 2011 vom „Johann Heinrich von Thünen Institut“ in Braunschweig zur Verfügung gestellt. 2012 enthielt die Gülle bereits ESBL-Resistenzen, so die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen, die zuvor von der FU Berlin durchgeführt worden waren.

Eine weitere Düngung für alle Parzellen erfolgte am 13.06.2012 mineralisch mit  $350\text{ kg/ha}$  Kalkammonsalpeter (27 %).

### *Pflanzenschutz 2012*

Nach der Pflanzung wurde über die gesamte Fläche ein Kohlnetz gespannt, um Schädlingsbefall zu vermeiden. 2012 wirkte das Kohlnetz gut, so dass keine Insektizide ausgebracht werden mussten. Der Weißkohl war aber von der Pilzinfektion „falscher Mehltau“ befallen. Die Pflanzen wurden deshalb dreimal mit einer Mischung aus drei Fungiziden behandelt. Sie wurden in folgenden Konzentrationen ausgebracht: Ortiva:  $1\text{L/ha}$ , Akrobat:  $2,5\text{kg/ha}$ , Eria:  $1,75\text{kg/ha}$ . Die Spritzungen erfolgten am 05.07., 20.07. und am 09.08.2012.

Zudem trat ein hohes Schneckenauftreten am Weißkohl auf. Deswegen wurde zweimal Schneckenkorn ausgebracht, jeweils  $40\text{ Körner}/\text{m}^2$ . Die Ausbringung erfolgte am 15.06. und 27.06.2012.

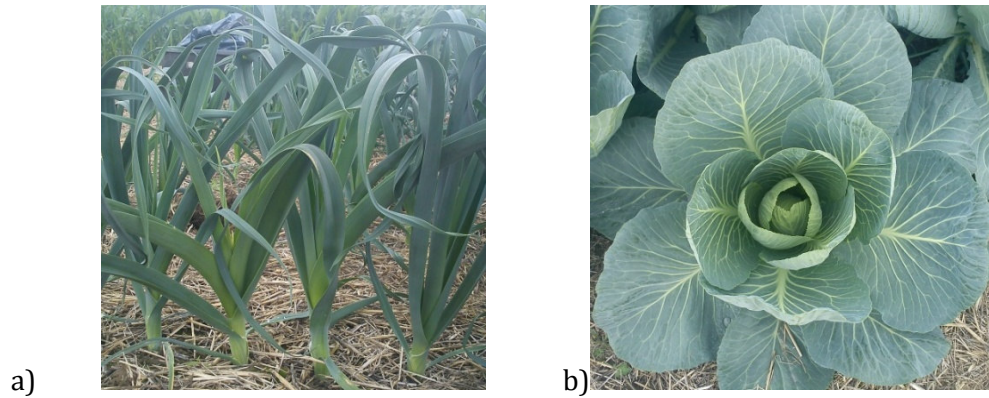
### *Pflanzenprobennahme 2012*

#### *Zwischenernte*

Eine Zwischenernte erfolgte am 11.07.2012. So konnten die Pflanzen auch in einem Zwischenstadium der Vegetationsperiode auf Antibiotikarückstände untersucht werden. Innere Blätter und die Wurzel von jeweils fünf Kohlpflanzen und je fünf Porreestangen pro Parzelle wurden zur mikrobiologischen Untersuchung an die FU Berlin versandt. Für die rückstandsanalytischen Untersuchungen wurden ein Weißkohl und zwei Porreestangen pro Parzelle geerntet. Danach wurde der Porree in junge und alte Blattabschnitte und Wurzel, der Weißkohl in Blätter des Kopfansatzes, äußere Blätter und Wurzel getrennt. Abbildung 29 zeigt



die Pflanzen zum Zeitpunkt der Zwischenernte, 2 Monate nach Pflanzung: Die Porreepflanzen waren etwa einen halben Meter groß, mit einem Durchmesser der Porreestange von etwa 2 cm. Beim Weißkohl hatte die Kopfbildung gerade begonnen.



**Abbildung 29: a) Porree und b) Weißkohl zum Zeitpunkt der Zwischenernte**

### *Ernte*

Die Ernte der Pflanzen fand am 26.09.2012 statt und erfolgte wie 2011. Abbildung 30 zeigt die Pflanzen zum Zeitpunkt der Ernte.

Für die mikrobiologischen Untersuchungen wurden Proben des essbaren Teils und der Wurzel genommen, jedoch wurde auf die Untersuchung des nicht essbaren Teils verzichtet. Bei den äußeren Blättern und auch der Wurzel kann schwer unterschieden werden, ob die anschließend detektierten Bakterien endophytisch oder oberflächlich vorlagen. Die Pflanzen und Wurzeln wurden pro Variante einzeln untersucht, so dass fünf Wiederholproben vorlagen.



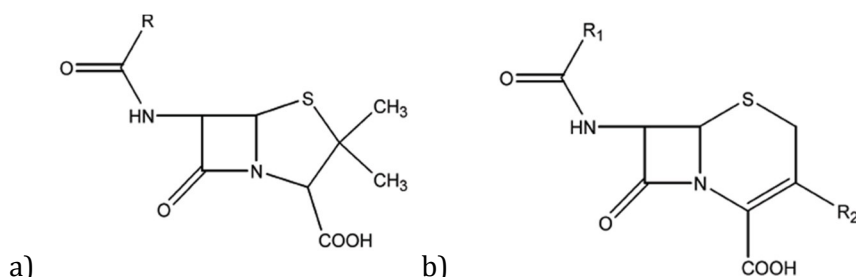
**Abbildung 30: Pflanzen zum Zeitpunkt der Ernte 2012; Parzellen gedüngt mit ENR-dotierter Gülle: a) Porree, b) Weißkohl**

## Bodenprobennahme 2012

Es wurden vor der Düngung, zwischen Pflanzung und Düngung (08.05.2012) und nach der Zwischenernte (11.07.2012) Bodenproben genommen. Vor der Pflanzung wurden zwei Proben entnommen: Eine Bodenprobe aus dem Bereich des Feldes, der später mit Porree bepflanzt wurde und eine Bodenprobe aus dem Bereich, der später mit Weißkohl bepflanzt wurde. Das Feld bzw. die Parzelle wurde jeweils an drei bis zehn Stellen beprobt, aus den einzelnen Beprobungspunkten wurde eine Mischprobe zusammengestellt. Bei der Zwischenernte wurden die Bodenproben an den Stellen entnommen, an denen die Pflanzen wuchsen, die zur Zwischenernte entnommen worden waren, somit wurde hier auf den Bohrstock verzichtet. Bei der Probennahme vor und nach der Düngung war der Boden durch die Saatbettbereitung ausreichend tief aufgelockert, so dass sich die Verwendung eines Bohrstockes erübrigte.

### 5.3.1 Methodenentwicklung zur Bestimmung der Ceftiofurgehalte in Pflanzen

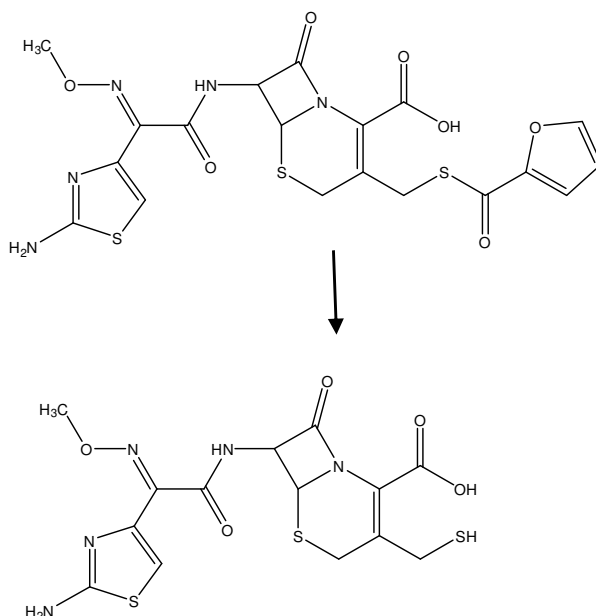
Im Feldversuch 2012 wurde erstmals Ceftiofur (CEF) eingesetzt. CEF gehört zu der Antibiotikaklasse der Cephalosporine, diese gehören wie auch die Penicilline zu den  $\beta$ -Lactamen. Abbildung 31 zeigt das Grundgerüst der Penicilline und das der Cephalosporine. Neben dem gemeinsamen  $\beta$ -Lactam-Ring und der Amidgruppe zwischen  $\beta$ -Lactam-Ring und Rest weisen die Penicilline einen Thiazolidinring und die Cephalosporine einen Dihydrothiazinring auf.



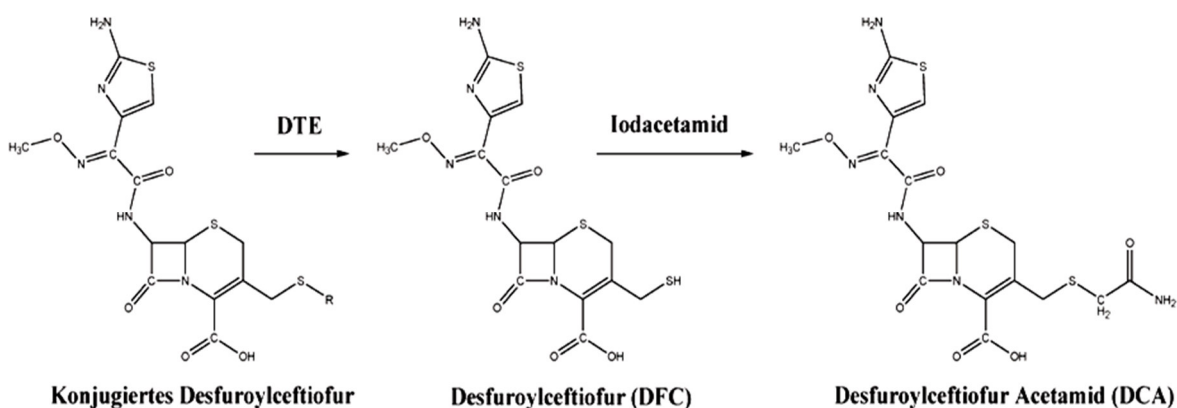
**Abbildung 31: Grundgerüst der a) Penicilline und der b) Cephalosporine [41]**

Cephalosporine werden in ähnlicher Weise von nukleophilen Reagenzien angegriffen wie die Penicilline. Das dabei resultierende Zersetzungsprodukt ist im Gegensatz zu der Penicilloinsäure (Struktur siehe Abbildung 3, Seite 23) instabil und zersetzt sich weiter in wässrigen Lösungen [17, 118, 194]. Außerdem wird CEF schnell in Desfuroylceftiofur (DFC) umgewandelt, indem Fursäure abgespalten wird [264] (siehe Abbildung 32). DFC ist durch

die Thiol-Gruppe sehr reaktiv und bindet z.B. an Proteine unter Bildung einer Disulfidbrücke [265]. Diese Reaktionen finden im Tierkörper statt, so dass im Urin hauptsächlich gebundenes DFC vorliegt. Zur Vermeidung dieser unerwünschten Bindungen bei der Rückstandsanalytik wird mittels Dithioerythritol (DTE) das DFC freigesetzt und mit Iodacetamid (IAA) zum Desfuroylceftiofuracetamid (DCA) umgesetzt (siehe Abbildung 33) [266].



**Abbildung 32: Umwandlung von Ceftriaxone in Desfuroylceftiofur durch Abspaltung von Fursäure [267]**



**Abbildung 33: Freisetzung von Desfuroylceftiofur mit Dithioerythritol und Stabilisierung durch Alkylierung mittels Iodacetamid [265].**

In den 90iger Jahren wurden verschiedene Studien zur Verstoffwechselung von CEF durchgeführt, dabei wurden die Tierarten Schwein [264, 268], Schaf [269], Rind [267, 270] und Ratte [267] untersucht. Im Unterschied zu den anderen Cephalosporinen, die weitgehend

Neben der Bildung von DFC, welches durch Spaltung mittels einer Esterase im Körper entsteht, werden auch mikrobielle Abbauprodukte im Urin nachgewiesen. Beispiele sind hier Polar A, B und C sowie ein Ceftiofur-Sulfoxid-Cystein-Thioester [267, 270]. Einige Verbindungen entstehen durch Aufspaltung des  $\beta$ -Lactamringes und sind somit nicht mehr antibiotisch aktiv [272]. Eine Übersicht über mögliche Metabolisierungsschritte von Ceftiofur zeigt Abbildung 34.



Zur Bestimmung von CEF und seiner Abbauprodukte in den Gemüse- und Bodenproben der Feldstudie 2012 musste zunächst eine rückstandsanalytische LC/MS-Methode inklusive Probenvorbereitung entwickelt werden. DFC und DCA wurden hierfür *in situ* gebildet (siehe Anhang Kapitel B.5 S.164). CEF ist kommerziell erwerblich. Als Ausgangspunkt für die LC-MS-Methode dienten die in dem Arbeitskreis Grote der Universität Paderborn entwickelten Methoden [240, 248] und eine Literaturrecherche:

Für die Extraktion von Cefotiofur wurde ein Borat- oder Ammoniumacetat-Puffer, pH 9 verwendet. In einigen Publikationen wurde die Verwendung eines Boratpuffers, hergestellt aus Borsäure oder Natriumtetraborat mit Zusatz von KCl bei verschiedenen Matrices, Milch, Blutserum oder der reine Puffer, beschrieben [266, 270, 272, 276–278]. Andere verwenden einen Ammoniumacetatpuffer [265]. In diesem Puffer wird auch das DTE für die Umwandlung von CEF in DFC gelöst. In der Literatur werden unterschiedliche Konzentrationen Borat, KCl und DTE zur Herstellung des Puffers und der Derivatisierungslösung verwendet: Meier (2007), und Witte *et al.* (2001) verwenden 50 mmol/L Borat, Witte setzt 500 mmol/L NaCl zu [276, 278]. Becker (2005) und Olson *et al.* (1998) nutzen einen 200 mmol/L-Puffer, mit einer Salzkonzentration von 200 mmol/L KCl [266, 270]. Makeswaran *et al.* (2005) nutzt einen 20 mmol/L Natriumtetraborat mit 50 mmol/L KCl und Hornish *et al.* (2002) und Beconi-Barker *et al.* (1995) 100 mmol/L Natriumtetraborat [265, 272, 277]. Für die in dieser Arbeit zu entwickelnde Methode zur Extraktion von CEF aus Pflanzenhomogenat wurden verschiedene Molaritäten an Borat und KCl für den Extraktions- und Derivatisierungspuffer getestet. Auch unterschiedliche Reaktionszeiten und Temperaturen für die DFC-Umwandlung wurden geprüft.

Nach der Umwandlung zum DFC erfolgt die Umwandlung zum DCA, siehe Abbildung 33 (S.91). Hierfür wird Iodacetamid verwendet. Auch hier wurden wieder Menge, Dauer und Temperatur für die Reaktionsbedingungen erprobt. Entgegen den Angaben in den oben genannten Literaturquellen wurde auch das Iodacetamid im Boratpuffer anstatt einem Phosphatpuffer gelöst.

Tabelle 19 gibt einen Überblick über die getesteten Bedingungen während der Methodentwicklung für CEF am Beispiel der Matrix Porree. Die endgültigen Bedingungen sind in Tabelle 20 aufgeführt.

**Tabelle 19: Überblick der erprobten analytischen Bedingungen in der Methodenentwicklung für die extraktive Derivatisierung von CEF aus Porree**

Dotierung CEF [µg/kg FG]	Umwandlung in DFC			Umwandlung in DCA			Extraktionsmittel /Puffer	SPE					Wiederfindung in %		
	Menge DTE	Reaktions-Zeit	Temperatur	Menge IAA	Zeit	Temperatur		pH	Kartusche	Konditionierung	Waschen	Elution	CEF	DFC	DCA
5000	ohne DTE			ohne IAA			Citratpuffer (0,1 mol/L Citronensäure, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , EDTA)	3,2	6cc HLB 200 mg	5 mL MeOH, 5 mL H <sub>2</sub> O	3 mL H <sub>2</sub> O, 3 mL 5% MeOH	6 mL Methanol (MeOH)	18,3	~0	~0
50													16,8	~0	~0
50							KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer (0,01 mol/L; 20% (w/v) TCA)	2,5					25,9	~0	~0
200							1. H <sub>2</sub> O/Acetonitril (ACN) (1:1); 2. H <sub>2</sub> O		C18 3cc 200 mg Bond Elut	3 mL ACN, 3 mL H <sub>2</sub> O	3 mL H <sub>2</sub> O	5 mL ACN	29,8	~0	~0
200							1. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /ACN (1:1); 2. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>						21,9	~0	~0
200							1. Borat (0,1 mol/L)/ACN (1:1); 2. Borat						22,7	~0	~0
5000	0,4 g	60 min	50° C	ohne IAA			Citratpuffer (0,1 mol/L Citronensäure, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , EDTA)	3,2	6cc HLB 200 mg	5 mL MeOH, 5 mL H <sub>2</sub> O	3 mL H <sub>2</sub> O, 3 mL 5% MeOH	6 mL MeOH	12,2	0,6	~0
50	0,02 g							3,2					~0	~0	~0
50	0,02 g						KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer (0,01 mol/L; 20% (w/v) TCA)	2,5					~0	~0	~0
5000	0,4 g			0,25 g	60 min	RT	Citratpuffer (0,1 mol/L Citronensäure, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , EDTA)	3,2					~0	~0	~0
50	0,02 g			0,02 g				3,2					~0	~0	~0
50	0,02 g			0,02 g			KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer (0,01 mol/L; 20% (w/v) TCA)	2,5					~0	~0	~0
5000		10 min	30° C	0,04 g	20 min	30° C	0,1 mol/L Borat +0,05 mol/L KCl		C18 3cc 200 mg Bond Elut	0,002 0,002 0,002	5 mL H <sub>2</sub> O	3 mL ACN	~0	~0	1,6
5000				0,04 g			0,1 mol/L Borat + 1 mol/L KCl						~0	~0	8,4
5000				0,05 g			0,1 mol/L Borat	200 µL FA					1,0	~0	0,3
50	0,0002 g			0,0005 g			0,1 mol/L Borat +0,05 mol/L KCl	400 µL FA					1,6	~0	~0
50	0,0002 g			0,0005 g			0,1 mol/L Borat + 1 mol/L KCl						~0	~0	~0

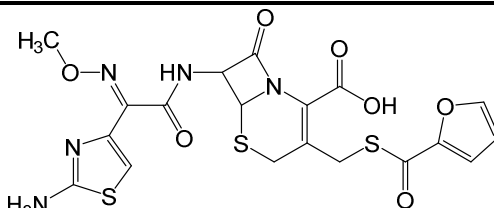
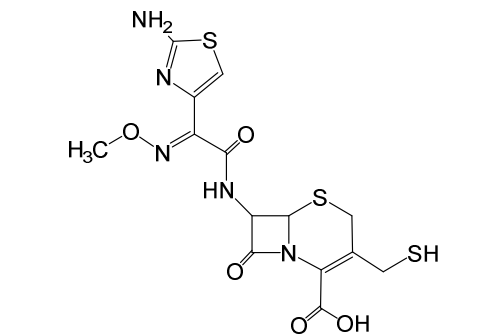
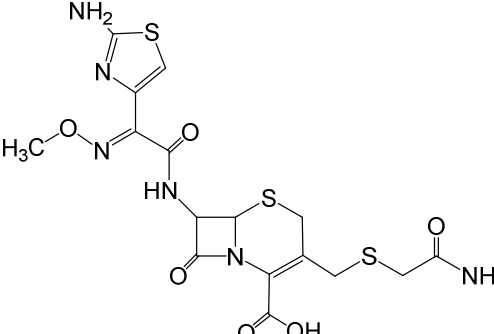
**Tabelle 20: Bedingungen für die extraktive Derivatisierung von Ceftiofur aus 5 g Pflanzenmaterial (Borat-Methode)**

Extraktion	Derivatisierung 1. Schritt	Derivatisierung 2. Schritt	Vorbereitung SPE
0,1 mol/L Borsäure; pH 9, KOH	0,02 g Dithioerythritol (DTE)	0,05 g Iodacetamid (IAA)	500 µL konz. Ameisensäure
30 min , 50° C		30 min , 50° C	10 min Zentrifugation

Nach der extraktiven Derivatisierung von CEF zu DCA wurde eine Festphasenextraktion und LC-MS angeschlossen. Für die Festphasenextraktion wurde eine C18-Kartusche (3cc 200 mg Bond Elut) verwendet, das Elutionsmittel war Acetonitril (Borat-Methode).

Zur LC-MS-Analytik wurde die im Mess- und Auswerteprogramm „Xcalibur“ erstellte Messmethode auf die Analyten CEF, DFC und DCA erweitert. Die neu entwickelte Tuningmethode, sowie die Vorläufer-Ionen und  $[M+H]^+$ -Fragmente (Produkt-Ionen) von CEF, DFC und DCA wurden als neue Scan Ereignisse in die dazugehörigen Segmente (Zeitfenster) der bereits vorhandenen Messmethode eingefügt. Tabelle 21 zeigt die charakteristischen Werte für CEF, DFC und DCA. Die bereits bestehende HPLC-Methode konnte verwendet, werden, da alle drei Analyten, innerhalb des programmierten Gradienten eluierten, so dass die LC-MS Methode der Rückstandsanalytik von AMO, ENR und TC um die Daten von CEF ergänzt wurde. DCA mit  $m/z$  von 487 eluierte bereits bei einer Retentionszeit ( $t_R$ ) = 5,7 min, gefolgt von DFC bei 8,5 min. DFC weist ein  $m/z$  von 430 auf. Am spätesten eluierte CEF mit  $t_R$  = 15,7 min. Das  $m/z$  von CEF beträgt 524. Alle drei Verbindungen fragmentieren in gleicher Weise: Das Hauptfragmentation ist  $m/z$  241 neben einer Vielzahl an wenig intensiven Fragmenten, wie  $m/z$  396 oder  $m/z$  285 (siehe Tabelle 21) [266, 273].

**Tabelle 21: Strukturen und Kenndaten für die MS/MS-Detektion von Ceftiofur und der Umwandlungsprodukte Desfuroylceftiofur und Desfuroylacetamid**

Stoff- klasse	Bezeich- nung	Abkür- zung	Struktur	Vorläuferion [m/z]	Stoßenergie [%]	Produkt-Ionen [m/z] (Peakinten- sitäten)	Retentionszeit [min]
β-Lactame	Ceftiofur	CEF		524	30	240,9 (100%) 395,8 (5-10%) 284,9 (5-10%) 196,9 (5-10%)	15,7
	Desfuroyl- ceftiofur	DFC		430	30	240,9 (100%) 395,8 (5-10%) 284,9 (5-10%) 196,9 (5-10%)	8,5
	Desfuroyl- ceftiofur- acetamid	DCA		487	30	240,9 (100%) 395,8 (5-10%) 284,9 (5-10%) 196,9 (5-10%)	5,7



Es wurde versucht, auch für die Probenvorbereitung eine Multimethode zu entwickeln, so dass AMO, ENR, CEF und deren Metabolite gleichzeitig zu erfassen sind. Die Borat-Methode wurde auch für die anderen Antibiotika ohne Zusatz von DTE und IAA mittels Wiederfindungsstudien getestet (siehe Tabelle 22 und Tabelle 23). Für CEF bzw. DCA konnte mit der Borat-Methode eine Wiederfindung von 9 – 30% bei unterschiedlichen Dotierungskonzentrationen für Porree und Weißkohl erreicht werden. Es wurde für alle Stoffe derselbe Ablauf zur Probenvorbereitung gewählt, jedoch wurden schließlich unterschiedliche Puffer und SPE-Kartuschen verwendet (siehe Tabelle 48 S.178).

**Tabelle 22: Wiederfindung [%] von Antibiotika und Umwandlungsprodukten in Porree**

Dotierung von Kontrollproben, junge Blattabschnitte, Ernte 2012, Borat-Methode, Matrixkalibrierung, N=2, n=2, n.n.=nicht nachgewiesen

Dotierung in µg/kg FG  Analyt	Wiederfindung [%]							
	5	8	10	25	50	100	200	1000
ENR	115,2 +/- 23,3	92,7 +/- 6,4	88,7 +/- 6,8	59,8 +/- 9,6	92,8 +/- 4,0	90,6 +/- 6,4	82,9 +/- 4,7	90,8 +/- 3,0
CIP	23,3 +/- 3,9	21,4 +/- 3,9	46,3 +/- 8,1	36,9 +/- 7,1	74,5 +/- 1,5	60,3 +/- 2,5	67,8 +/- 1,6	86,4 +/- 4,6
AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
AMA	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Diketo	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	7,3 +/- 3,7	17,0 +/- 0,7
e-TC + TC	25,5 +/- 3,0	13,9 +/- 4,6	15,7 +/- 2,8	9,4 +/- 4,9	22,1 +/- 1,0	11,5 +/- 5,0	9,8 +/- 1,5	12,2 +/- 1,7
CEF	n.n.*	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
DCA	n.n.	26,8 +/- 3,7	29,9 +/- 3,8	28,5 +/- 4,2	23,2 +/- 0,5	14,1 +/- 4,3	8,9 +/- 0,7	11,8 +/- 0,1
DFC	n.n.*	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

\* CEF und DFC wurden nicht wiedergefunden, da die Extraktionsmethode zur Derivatisierung beider Stoffe zum DCA führt.

**Tabelle 23: Wiederfindung [%] von Antibiotika und Umwandlungsprodukten in Weißkohl**

Dotierung von Kontrollproben, Kopf, Ernte 2012, Borat-Methode, Matrixkalibrierung, N=2, n=2, n.n.=nicht nachgewiesen

Dotierung [µg/kg FG] Analyt	Wiederfindung [%]							
	5	8	10	25	50	100	200	1000
ENR	48,1 +/- 5,2	69,6 +/- 8,1	70,4 +/- 10,9	68,6 +/- 13,1	79,3 +/- 7,2	74,2 +/- 9,6	66,5 +/- 4,1	63,4 +/- 4,6
CIP	55,9 +/- 9,0	56,1 +/- 7,9	62,8 +/- 9,0	70,0 +/- 10,0	60,6 +/- 12,3	71,7 +/- 5,9	59,7 +/- 8,1	59,2 +/- 4,9
AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
AMA	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Diketo	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	8,7 +/- 5,5	13,0 +/- 10,3	18,5 +/- 2,5	47,0 +/- 6,5
e-TC + TC	34,3 +/- 5,3	35,1 +/- 6,6	29,9 +/- 10,4	30,2 +/- 13,5	41,9 +/- 9,9	39,4 +/- 14,5	37,4 +/- 13,5	38,4 +/- 2,6
CEF	n.n.*	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
DCA	22,5 +/- 2,8	17,1 +/- 3,3	11,8 +/- 2,3	21,6 +/- 1,6	17,5 +/- 2,0	19,4 +/- 0,9	13,8 +/- 3,6	11,5 +/- 1,1
DFC	n.n.*	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

\* CEF und DFC wurden nicht wiedergefunden, da die Extraktionsmethode zur Derivatisierung beider Stoffe zum DCA führt.

### 5.3.2 Ergebnisse der Rückstandsanalysen der Anbauperiode 2012

#### *Pflanzen*

Die oberirdischen Proben der Zwischenernte 2012 (Tabelle 24), die auf Parzellen mit ENR-dotierter Schweinegülle wuchsen, wiesen einen minimalen ENR-Rückstand auf. Für die Wurzel konnte ein ENR-Gehalt von 2,0 µg/kg für Porree und 1,7 µg/kg für Weißkohl gemessen werden. AMO und CEF bzw. DCA wurden nicht nachgewiesen, ebenso keine Metaboliten (AMA, Diketo, DFC).

**Tabelle 24: Ergebnisse der Zwischenernte 2012**

150 mg/m<sup>2</sup> Dotierung im Boden, gedüngt mit Schweinegülle 2 L/m<sup>2</sup>, 5 g Einwaage Homogenat; Extraktant siehe Tabelle 48 S.178, externe Kalibrierung, N=2, n=2, , Ergebnisse in µg/kg FG Homogenat, n.n.=nicht nachgewiesen, BG=Bestimmungsgrenze

Pflanze	Probe	Dotierung	AMO	AMA	Diketo	ENR	CIP	CEF
Porree	junge Blattabschnitte	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	< BG	n.n.	n.n.
		CEF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	alte Blattabschnitte	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		CEF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	Wurzel	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	2,0 +/- 0,1	n.n.	n.n.
		CEF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Weißkohl	Kopf	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	< BG	n.n.	n.n.
		CEF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	äußere Blätter	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	1,7 +/- 0,1	n.n.	n.n.
		CEF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	Wurzel	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		CEF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Die Proben der Ernte 2012 (Tabelle 25) zeigten bis auf die Wurzeln von Porree und Weißkohl der „ENR-Parzelle“ keine Rückstände. Aus den Wurzeln des Porrees ließen sich 0,5 µg/kg FG ENR extrahieren. In den Weißkohlwurzeln wurden ebenfalls 0,5 µg/kg FG ENR nachgewiesen.

**Tabelle 25: Ergebnisse der Ernte 2012**

150 mg/m<sup>2</sup> Dotierung im Boden, gedüngt mit Schweinegülle 2 L/m<sup>2</sup>, 5 g Einwaage Homogenat; Extraktant siehe Tabelle 48 S.178, externe Kalibrierung, N=2, n=2, Ergebnisse in µg/kg FG Homogenat, n.n.=nicht nachgewiesen

Pflanze	Probe	Dotierung	AMO	AMA	Diketo	ENR	CIP	CEF
Porree	junge Blattabschnitte	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		CEF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	alte Blattabschnitte	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		CEF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	Wurzel	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	0,5 +/- 0,1	n.n.	n.n.
		CEF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Weißkohl	Kopf	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		CEF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	äußere Blätter	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		CEF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	Wurzel	oD	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
		ENR	n.n.	n.n.	n.n.	0,5 +/- 0,3	n.n.	n.n.
		CEF	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Der Vergleich der Ergebnisse der Zwischenernte mit der Ernte im Anbaujahr 2012 zeigt, dass der messbare Antibiotikagehalt abgenommen hat. Wie in Kapitel 3.4.3 (S.56) wiedergegeben berechnen Rein *et al.* (2011) [228] und Goktas *et. al.* (2011) [218] unterschiedliche Kontaminantenkonzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten des Pflanzenwachstums. Rein *et al.* errechnen für Sommerweizen um den 75. Wachstumstag die höchste Kontaminantenkonzentration in Blatt und Frucht. Die Zwischenernte 2012 erfolgte um den 60. Wachstumstag. Unter der Annahme, dass Sommerweizen, Porree und Weißkohl ein ähnliches Verhalten bei der Aufnahme von Antibiotika zeigen, könnte es möglicherweise sein, dass die Zwischenernte gerade zu dem Zeitpunkt erfolgte, als die Pflanzen gerade die höchste Antibiotikakonzentration aufgenommen hatten. Es ist aber auch möglich, dass auf-

grund der Messungenauigkeit durch die Komplexität der Analytprobe, die an der Nachweisgrenze liegenden Werte der Zwischenernte in den Ernteproben nicht erneut gemessen werden konnten.

In den Wurzeln ist wie in den Blättern ein Rückgang in der ENR-Kontamination zu erkennen. Dies ist im Gegensatz zu den Berechnungen von Rein *et al.*, der für die Wurzeln einen gleich bleibenden Gehalt bestimmte. Sie nahmen bei ihren Berechnungen eine konstante Kontaminantenkonzentration an. Die Analyse des Bodens der ENR-Parzellen zeigte jedoch einen Rückgang des extrahierbaren Anteils (siehe Tabelle 26, S.102). Andererseits ist es auch möglich, dass es bei zunehmender Größe und Dicke der Wurzeln vermehrt zur Lignifizierung kommt, wobei die Antibiotika irreversibel eingeschlossen werden könnten [217].

Ergänzend wurden in Gefäßversuchen von Boonsaner *et al.* (2010) in 4-Wochen-alten-Sojabohnen nach Umsetzung auf antibiotikahaltige Erde in den ersten 6 Tagen Antibiotikagehalte festgestellt, nach 12 Tagen jedoch nicht mehr [227].

Ein höherer Befund in den Wurzeln im Vergleich zu den Blättern, wie dies im Feldversuch 2012 der Fall war, stellten in Gefäßversuchen auch Xiao *et al.* (2012) für Ciprofloxacin in Chinakohl, Rettich, Tomate und Schlangenbohne [221] und Eggen *et al.* (2011) in Möhren und Gerste [222] fest

Yu *et al.* (2012) stellten fest, dass sich ENR hauptsächlich in den oberen 5 cm des Bodens wiederfindet [204]. Da Porree- und Weißkohl beide eine Wurzeltiefe von 30 bis 60 cm ausbilden [279], ist es möglich, dass Wurzeln der älteren/erntereifen Pflanzen den ENR-belasteten Oberboden nicht mehr erreichten, sondern dies nur bei den jüngeren Pflanzen der Fall war.

### *Boden 2012*

Im Boden wurde direkt nach der Düngung erwartungsgemäß ENR nachgewiesen (siehe Tabelle 26). Auch zum Zeitpunkt der Ernte wurde ENR im Boden detektiert. Die anderen Antibiotika und deren Umwandlungsprodukte konnten nicht nachgewiesen werden.

Die nachgewiesenen Rückstände deuten darauf hin, dass ENR zur Aufnahme in die Pflanze zur Verfügung steht. Zur Bestimmung des Antibiotikagehaltes im Boden wurde die Bodenprobe mit  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ -Puffer geschüttelt, so dass nur extrahierbare Anteile gemessen wurden. Eine Ablösung der Antibiotika von den Bodenpartikeln durch Wasser und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen ist auch auf dem Feld und damit in der Umwelt denkbar. Außerdem zeigten dem Projekt vorhergehende Hydrokulturversuche, dass ENR und CIP von Weißkohl und Porree aus wässriger Lösung aufgenommen werden können [248]. Somit wird durch zwei Hinweise (nachge-

wiesene Rückstände im Boden und bestätigte Pflanzenaufnahme in Hydrokultur) ersichtlich, dass die Pflanzen vom Feldversuch ENR und CIP aufnehmen. Das Potential von Porree und Weißkohl ENR aufzunehmen, konnte durch in Spuren nachgewiesene ENR-Rückstände in der Pflanze bestätigt werden.

Zum Zeitpunkt der Düngung konnte ein extrahierbarer ENR-Gehalt im Boden der Weißkohlparzelle von 40 µg/kg FG gemessen werden. Im Boden der Porreeparzelle konnte eine Konzentration von 28 µg/kg FG gemessen werden. Die beiden Bodenproben zeigen Unterschiede im ENR-Gehalt, obwohl zum Zeitpunkt der Düngung Porree- und Weißkohlparzelle gleich waren, da die Düngung vor der Pflanzung erfolgte. Die Unterschiede sind zum einen durch die Matrix Boden zu erklären: Boden bzw. eine wässrige Lösung des Bodens ist sehr komplex [280]. Eine Aufreinigung vor der Messung erfolgt nur zum Teil, da es ansonsten zu starken Verlusten von Antibiotika während der Probenvorbereitung kommt. Die Bodenbestandteile, wie Huminstoffe oder Metallkationen können die Bestimmung des Antibiotikagehaltes stören. Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Messwerte kann die Verteilung der Gülle auf der Parzelle sein. Die Gülle wurde per Hand eingeharkt, es ist somit möglich, dass es trotz sorgfältiger Arbeit zu verschiedenen Güllekonzentrationen über die Parzelle kam. Die Variation in der Messung des ENR-Gehaltes im Boden zeigt auch die Standardabweichung von 27 bzw. 28%.

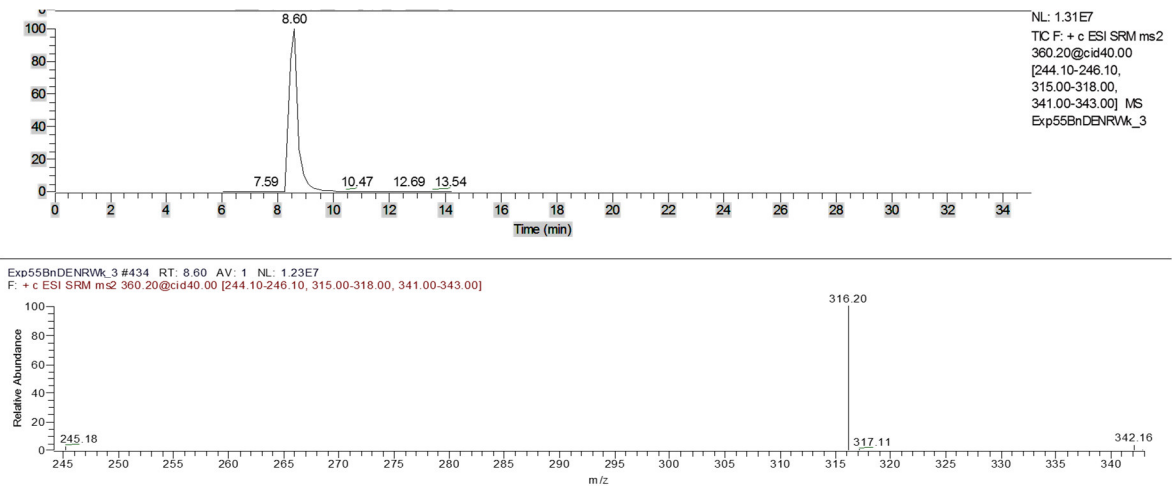
Die Intensitäten der CIP-Peaks waren zu gering für eine Quantifizierung, so dass hier kein valider Gehalt an CIP im Boden errechnet werden konnte. In den Bodenproben, die zur Ernte genommen wurden, konnte ein wesentlich geringerer ENR-Gehalt extrahiert werden. Für die Weißkohlparzelle wurden 6 µg/kg FG bestimmt und für die Porreeparzelle 5 µg/kg FG. Der extrahierbare ENR-Gehalt im Boden ist somit während der Wachstumsperiode um eine halbe Größenordnung zurückgegangen.

**Tabelle 26: Antibiotika und Umwandlungsprodukte im Boden des Versuchsfeldes 2012**

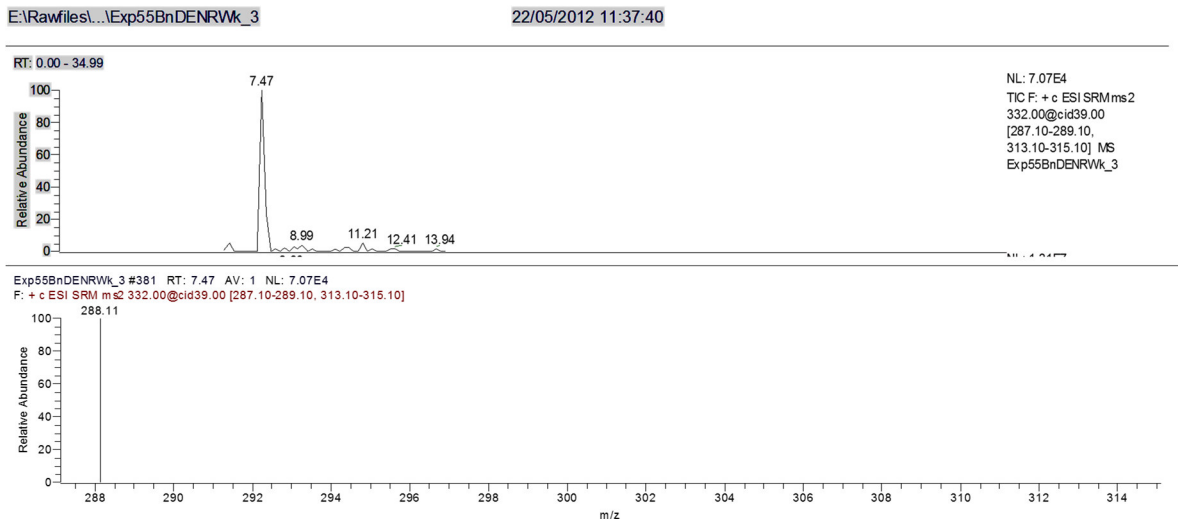
150 mg/m<sup>2</sup> Dotierung im Boden, Bodenfraktion < 0,5 mm, 5 g Einwaage, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Extraktant, externe Kalibrierung, N=2, n=3, n.n.=nicht nachgewiesen

Bodenprobe	Parzelle	Gehalt [µg/kg FG]	
		Antibiotikum	Umwandlungsprodukt
		ENR	CIP
vor der Düngung	ganzes Feld	n.n.	n.n.
zum Zeitpunkt der Düngung	Weißkohl	40,4 +/- 10,9	n.n.
	Porree	27,7 +/- 7,8	n.n.
zum Zeitpunkt der Ernte	Weißkohl	6,0 +/- 1,5	n.n.
	Porree	4,7 +/- 1,2	n.n.

a)



b)



**Abbildung 35: Massenchromatogramm und Fragmentspektrum von a) ENR und b) CIP im Boden**

Weißkohlpazelle, gedüngt mit ENR-dotierter Schweinegülle [ $\beta$ =75 mg/kg], ( $t_R$  = 8,60 min), LC-MS/MS, SRM-Modus

Die geringe Wiederfindung von ENR im Boden zum Zeitpunkt der Ernte im Vergleich zum Zeitpunkt der Düngung kann verschiedene Ursachen haben: Es kommt insbesondere durch biologische Transformationsprozesse zu einer intensiven Degradation und Inaktivierung der Antibiotika, diese wird durch Sequestrierung (Festlegung im Boden) gehemmt [7].

Yu *et al.* (2012) schrieben, dass über 90% des applizierten ENR von fünf verschiedenen Böden adsorbiert wurde. Bei Tonmineralien lag die Sorption bei über 98%, ENR lagert sich hier in die Mineralschichten ein [204]. Auch Untersuchungen von Uslu *et al.* (2008) ergaben für

lehmigen Sand mit der höchsten Konzentration an organischem Material einen hohen Sorptionsgrad von ENR. Leal *et al.* (2013) schreiben, dass Fluorchinolone selbst in einem Boden mit viel Sand und wenig organischen Anteil nicht ausgewaschen werden. Sie geben Kationenaustausch als wichtigsten Sorptionsmechanismus an [281].

Sorption, Abbau und geringe Pflanzenaufnahme können ebenso Gründe sein, weswegen die anderen Antibiotika nicht nachgewiesen werden konnten. Subbiah *et al.* (2011) beschreiben, dass die Sorption von Antibiotika am größten bei schluffigen Lehmböden war, gefolgt von sandigem Lehm. Sandböden zeigten das geringste Sorptionsvermögen [202]. Im Feldversuch lag ein sandiger schluffiger Lehmboden mit einem Schluffanteil von 70%. Ein höherer Schluffanteil bedeutet mehr Sorptionsplätze, die zur Verfügung stehen und die Antibiotika binden können.

Kim *et al.* (2012) stuften AMO als hochmobil im Boden ein. [203]. Boxal *et al.* beschreiben einen schnellen Abbau von AMO, sie berechneten eine Halbwertszeit von einem Tag für AMO. Sie dotierten luftgetrockneten Boden mit 1 mg/kg AMO [220]. Auch Kotzerke *et al.* (2011) untersuchten den Abbau von AMO in Boden und auch Gülle: Bereits kurz nach Zugabe von AMO zum Boden konnten sie kein AMO mehr extrahieren oder es war kein Effekt bezüglich des Bakterienwachstums sichtbar [282]. Vries-Hospers *et al.* (1993) beschreiben, dass die Bindung an Gülle- oder Bodenbestandteile einen größeren Einfluss auf den Aktivitätsrückgang haben als vorhandene  $\beta$ -Lactamasen [283].

Um Hinweise auf den Abbau und der Bildung möglicher Umwandlungsprodukte der  $\beta$ -Lactame zu gewinnen, wurden ergänzende Sorptionsstudien durchgeführt (siehe Kapitel 5.3.3, S.104)

### 5.3.3 Verhalten von CEF und AMO in Gülle und Boden: Sorptionsstudien

Die rückstandsanalytischen Untersuchungen von Porree und Weißkohl führten zu keinen Befunden auf die der Gülle zudosierten  $\beta$ -Lactame, AMO und CEF bzw. die Umwandlungsprodukte AMA, Diketo sowie DFC und DCA. In der Literatur wird die Reaktivität von AMO und CEF in unterschiedlichen Matrices wie tierischem Geweben, Tierexkrementen, Böden, und Puffer beschrieben [275, 284–286, 287, 288].

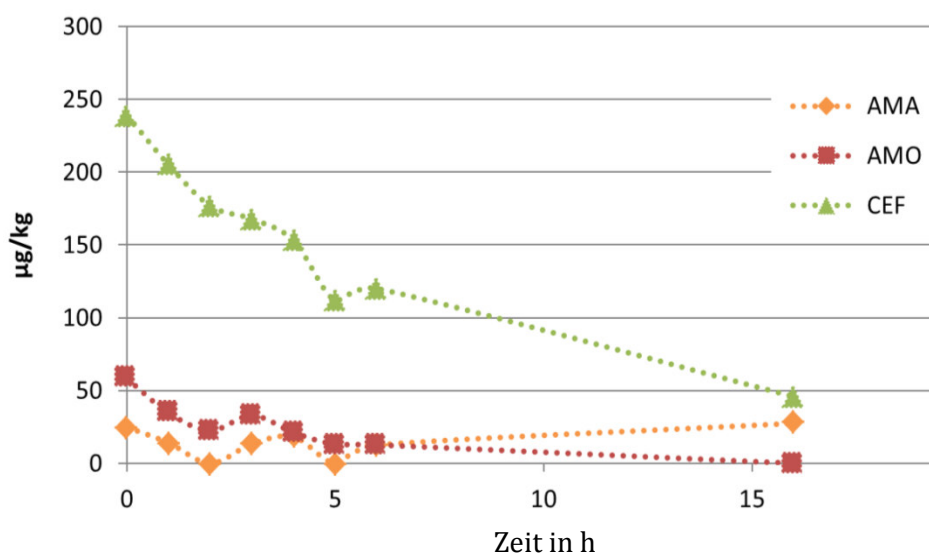
Um Hinweise auf Umwandlungsprodukte der  $\beta$ -Lactame zu erhalten, wurde der Abbau bzw. die Extrahierbarkeit der Antibiotika mittels zeitabhängiger Wiederfindungsstudien untersucht. Blindproben von Gülle und Boden der Feldversuche wurden in Wasser suspendiert und mit AMO und CEF dotiert. Nach bestimmten Zeitabständen wurde die flüssige Phase



beprobte und mittels LC/MS analysiert. Die gemessenen Konzentrationen wurden in Abhängigkeit von der Zeit graphisch ausgewertet.

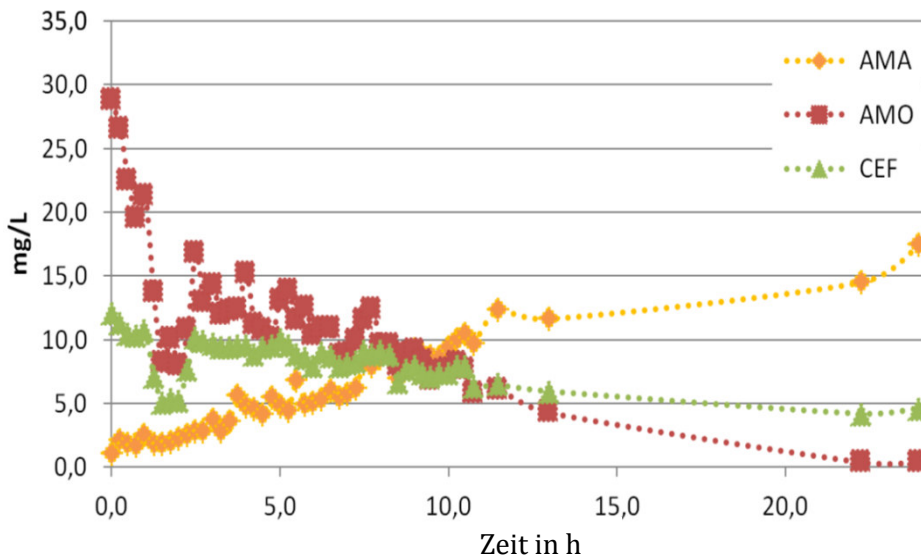
Die Ergebnisse zeigen einen deutlichen Abfall der extrahierbaren Anteile von AMO und CEF aus dem Boden mit zunehmender Suspensionszeit. Bei AMO wurde die simultane Bildung von AMA beobachtet. Diketo wurde nicht nachgewiesen (Abbildung 36).

Der Konzentrationsverlauf der Antibiotika in Gülle ergibt ein ähnliches Bild: Die Konzentration nimmt bei den Antibiotika mit der Zeit ab, besonders deutlich ist dies im Fall von AMO zu erkennen. Weiterhin konnte die Bildung von AMA auch in Gülle beobachtet werden (Abbildung 37).



**Abbildung 36: Extrahierte  $\beta$ -Lactam-Konzentration aus Boden, als Funktion der Zeit: AMA wurde durch Umwandlung von AMO gebildet.**

Boden der Kontrollparzellen, mit 750 µg/kg FG AMO und CEF dotiert, homogenisiert und bei RT inkubiert;  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ -Extraktant, externe Kalibrierung, N=1, n=2



**Abbildung 37: Umwandlung und Sorption von AMO und CEF in Gülle als Funktion der Zeit: Bildung der Penicilloinsäure von AMO.**

Gülle mit 75 mg/L AMO und CEF dotiert, inkubiert bei Raumtemperatur, externe Kalibrierung, N=1, n=2

Der Verlust der Antibiotika kann die Folge einer hohen Sorption der Antibiotika an den Boden [203] oder einer schnellen Zersetzung [7] sein. Dabei ist zu beobachten, dass die Extraktion von CEF gegenüber AMO über den gesamten Zeitraum höher ist. Weiterhin ist beachtenswert, dass die Aktivität von  $\beta$ -Lactamen im bodengebundenen Zustand erhalten bleiben kann [202].

### 5.3.4 „Spectral Counting“: Hinweise auf Umwandlungs- und Abbauprodukte von CEF und AMO

#### 5.3.4.1 Prinzip „Spectral Counting“

Für die Rückstandsanalytik wurden die  $m/z$ -Signale der Quasimolekülen bzw. Fragmente der Antibiotika und Umwandlungsprodukte mittels *selected-reaction-mode* (SRM) im Massenspektrometer gemessen (siehe Kap. B.6.4 S.168). Neben den MS/MS-Spektren der SRMs wurden auch MS-Spektren über den gesamten Massenbereich ( $m/z$  150-1200) aufgenommen (*full-MS*). Um Hinweise auf weitere Umwandlungsprodukte von AMO und CEF zu erhalten, wurden *full-MS*-Spektren ausgewählter Proben nach der „*spectral counting*“ Methode ausgewertet. Diese aus der Protein-/Peptid-MS-Analytik bekannte Methode [289–291] läuft nach folgendem Prinzip ab:

Beim *spectral counting* wird das Verhältnis der Anzahl der aufgenommenen MS/MS-Spektren (*spectral count*) von Peptiden in der Blindprobe zur Anzahl des gleichen Peptids in der Probe berechnet. Es werden ausschließlich die Peptide zur Berechnung genutzt, die bei der Spaltung eines bestimmten Proteins für dieses Protein einzigartig sind, d.h. sie treten bei der Spaltung keines anderen Proteins auf (Liu *et al.* 2004). Je abundanter ein Protein in einer Probe ist, desto häufiger werden Massenspektren der zugehörigen Peptide aufgenommen. Somit liefert die ermittelte Anzahl der Spektren, in denen das „einzigartige“ (*unique*) Peptid detektiert wurde, Hinweise auf die relative Quantität des zu bestimmenden Proteins in der Analysenprobe. Wird die Anzahl der MS/MS-Spektren mit denen einer Blindprobe verglichen, so wird von einer „Semiquantifizierung“ gesprochen.

Für die Adaption auf die hier auszuwertenden rückstandsanalytischen MS-Daten wurde ein Suchalgorithmus (Perl-Skript, siehe Anhang Kapitel C, S.183) entwickelt, der in den Massenchromatogrammen alle  $m/z$ -Signale mit einer Intensität (*normalization level*) größer  $10^4$  und Angabe der Retentionszeit und Probenbezeichnung aus den Rohdaten herausfiltert. Die Anzahl der Spektren, in denen eine bestimmte Masse auftrat, wurde bestimmt. Der Begriff Masse wird zwecks Vereinfachung hier für das entsprechende  $m/z$ -Signal des Quasimoleküls ( $MH^+$ ) verwendet. Aufgrund der Nutzung einer ESI-Quelle im Positivmodus und der niedrigen Molmassen der Analyt-Moleküle ( $m/z < 750$ ) wird davon ausgegangen, dass alle  $m/z$ -Signale den einfach geladenen Quasimolekülen ( $MH^+$ ) zuzuordnen sind.

Für die Auswertung wurden die verschiedenen Proben wie folgt gruppiert:

- Wirkstoff-Standardlösung, als Multistandard und einzeln
- Gemüsefeldproben, die von AMO- oder CEF-dotierten Versuchspartzellen stammen und
- Kontrollproben von undotierten Partzellen
- Proben mit ENR oder TC, als weitere Kontrollproben

Die Anzahl der aufgenommen MS-Spektren einer bestimmten Masse wurde für jede Probengruppe summiert und miteinander verglichen, so dass hier (im weitesten Sinne) von *spectral counting* gesprochen werden kann. Als Beispiel sei das Signal  $m/z = 367$  bei einer Retentionszeit von ca. 3 min genannt: Es wurde in 5633 Spektren von AMO-Standardproben registriert und auch in 13 Spektren von alten Blattabschnitten des Porrees, der auf einer Versuchspartzele wuchs, die mit AMO-dotierter Schweinegülle gedüngt worden war. In Porreeproben der Kontrollpartzele trat das Signal nicht auf. Die Häufigkeit der Registrierungen dieses Signals in MS-Spektren des AMO-Standards und das Fehlen in der Kontrollprobe kann als Hinweis gewertet werden, dass in den Porreeblättern einiger Proben ein Umwandlungsprodukt von AMO vorliegt.

Tabelle 27 zeigt ausgewählte Daten des *spectral countings*. Als Beispiel werden die Messwerte zweier Standardproben von CEF (m/z 524) und AMO (m/z 366) aufgeführt. Eine Zeile in der Tabelle 27 repräsentiert ein Spektrum, indem die jeweilige zu diagnostizierende Masse aufgetreten ist.

**Tabelle 27: Ausgewählte Daten für *spectral counting*: CEF und AMO-Standardproben (1 mg/L)**

Eine Zeile entspricht einem „*spectral count*“

m/z	Probenbezeichnung	Retentionszeiten [min]	Peakintensität im MS-Spektrum
366	AMO_1	3,0	1105437
366	AMO_1	3,1	2646198
366	AMO_1	3,2	1905121
366	AMO_1	3,3	811362
366	AMO_1	3,4	265350
366	AMO_2	3,1	1319167
366	AMO_2	3,1	3673681
366	AMO_2	3,2	2517630
366	AMO_2	3,3	1086324
524	CEF_1	15,4	8867716
524	CEF_1	15,5	10557002
524	CEF_1	15,6	7622776
524	CEF_1	15,7	4820115
524	CEF_1	15,8	4598400
524	CEF_1	15,9	4016438
524	CEF_1	16,0	1665786
524	CEF_1	16,1	588218
524	CEF_1	16,2	255181
524	CEF_2	15,4	1135474
524	CEF_2	15,5	9322964
524	CEF_2	15,6	10949002
524	CEF_2	15,7	7578810
524	CEF_2	15,8	4534230
524	CEF_2	15,9	4586191
524	CEF_2	16,0	3985278
524	CEF_2	16,1	1441652
524	CEF_2	16,2	406528

#### 5.3.4.2 CEF-Counting

Die Vorgehensweise bei der hier angewendeten Variante des *spectral counting* wird an einem weiteren Beispiel näher erläutert. Dabei geht es um Hinweise auf MS-Daten möglicher Umwandlungsprodukte des Cefotiofur:

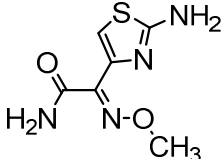
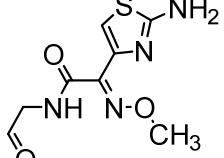
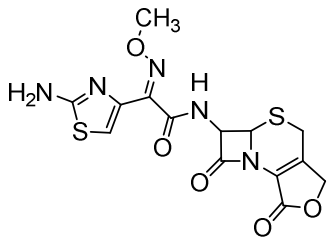
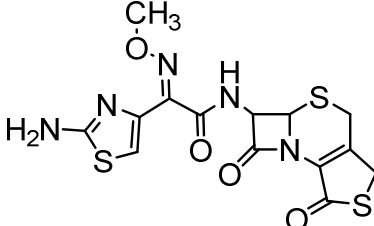
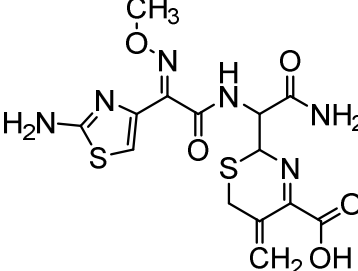
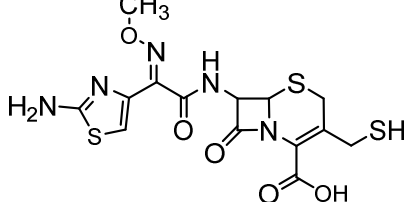
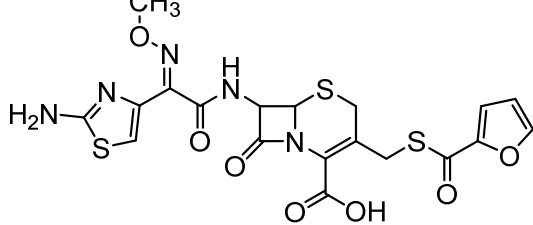
Als Beispiel wird die Masse bei  $m/z$  456 gewählt. Sie tritt in 370 Spektren bei einer Retentionszeit von 16,9 min auf. Um diese Werte zu erhalten, wurden folgende Schritte durchgeführt: Zuerst wurden die Daten in den Tabellen, die aus der Filterung der Rohdaten erhalten worden waren, nochmals „CEF-spezifisch“ gefiltert, denn es konnten aufgrund des sehr großen Datenumfangs nicht alle Massen ausgewertet werden. Die Daten wurden nach allen Proben selektiert, die ausschließlich CEF bzw. DFC oder DCA enthielten. Kontrollproben und Proben, die auch andere Antibiotika enthalten konnten, wurden zunächst nicht beachtet. Alle Massen, die in mehr als 100 Spektren in den CEF-Proben auftauchten, wurden erfasst. Anschließend wurden alle Proben ausgewertet, in denen die Masse  $m/z$  456 detektiert wurde, unabhängig davon, ob es sich um eine CEF-Probe handelte oder eine Kontrollprobe etc. Eine CEF-Probe war entweder eine Pflanzenprobe aus einem Wiederfindungsexperiment (im Labor dotierte Kontroll-Gemüseprobe) oder eine Feldprobe, die von einer Parzelle stammte, die mit CEF-dotierter Gülle gedüngt worden war. Es wurde geprüft, bei welcher Retentionszeit die Masse detektiert wurde und in welchen Proben die Masse überwiegend auftrat. Es wurde jeweils ein Retentionszeitfenster bis zu 2 min ausgewertet. Des Weiteren wurden nur Proben gewertet, in denen die Masse in mindestens zwei Spektren zur gleichen Retentionszeit auftrat. Die Masse  $m/z$  456 trat häufiger in CEF-Proben als in Kontrollproben auf, somit wurde angenommen, dass diese möglicherweise einem Umwandlungsprodukt von CEF zuzuordnen ist.

Wie im obigen Abschnitt beschrieben, wurde für alle Massen verfahren, die in insgesamt mehr als 100 Spektren in den CEF-dotierten Proben auftraten. Tabelle 29 (S. 112) zeigt die Massen und die Anzahl der zugehörigen Spektren, die häufig in den CEF-Proben registriert wurden.

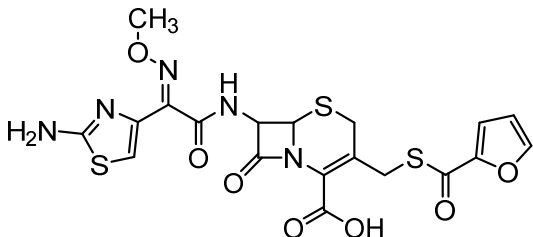
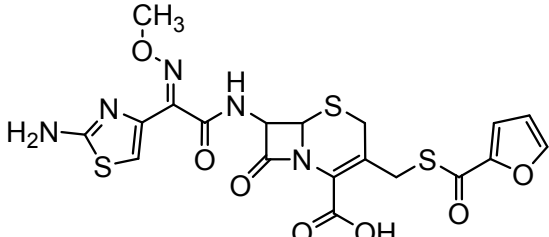
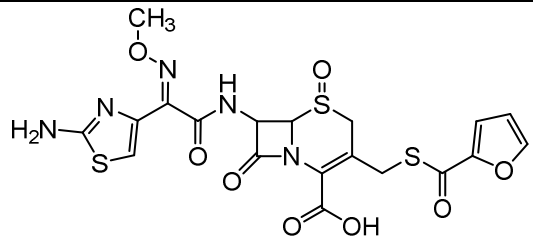
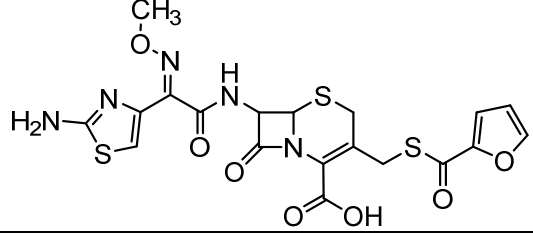
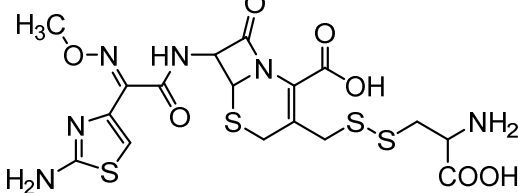
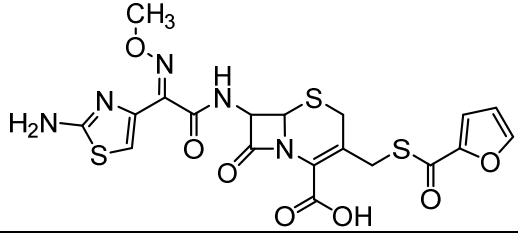
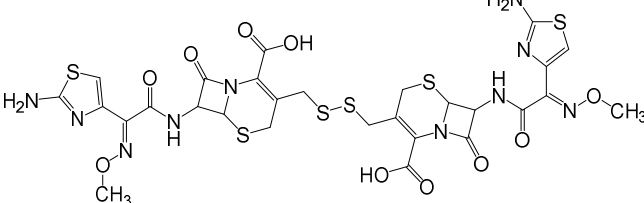
### *Literaturrecherche*

Parallel zum *spectral counting* wurde eine Literaturrecherche zu möglichen Umwandlungsprodukten bzw. Abbauprodukten von CEF durchgeführt. Tabelle 28 zeigt Strukturen von Umwandlungsprodukten, die in der Literatur beschrieben sind. Neben Natrium- und Kaliumaddukten sowie Dimeren werden Oxidationsprodukte, wie Desacetylcefotaxim und Umwandlungsprodukte, wie DFC-Thiolacton oder 2-Amino- $\alpha$ -(methoxyimino)-4-thiazolacetamid (AMTA) beschrieben.

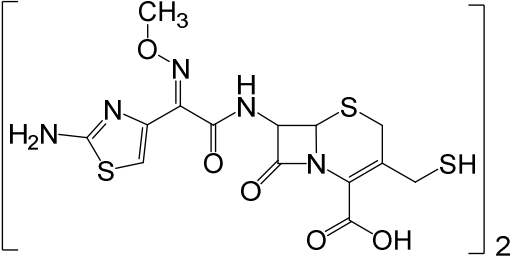
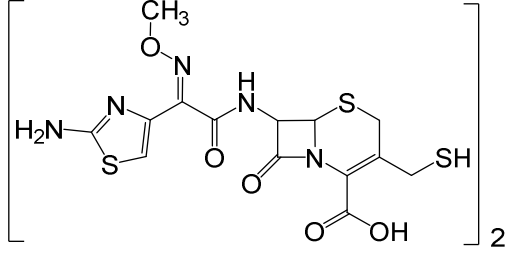
**Tabelle 28: Umwandlungs- und Abbauprodukte von CEF, nach Literaturangaben**

m/z	Ion	Name	Struktur	Literatur
201	M+H	2-Amino- $\alpha$ -(methoxyimino)-4-thiazolacetamid (AMTA)		[292] [275]
243	M+H	CEF-Aldehyd		[273] [286]
396	M+H	3-Desacetylcefotaximlacton		[267]
412	M+H	DFC-Thiolacton		[267, 275, 286]
413	M+H	Ammoniumdesthiofuroylceftiofur		[275]
414	M+H	Desacetylcefotaxim		[267]
430	M+H	DFC		[267]

**Fortsetzung Tabelle 28: Umwandlungs- und Abbauprodukte von CEF, nach Literaturangaben**

m/z	Ion	Name	Struktur	Literatur
468	M+K	DFC		[273]
524	M+H	CEF		[267]
540	M+H	„ox-CEF“		[287]
546	M+Na	CEF		[287]
549	M+H	DFC-Cystein-disulfid		[274, 275]
562	M+K	CEF		[273]
857	M+H	DFC-Disulfid		[267, 286]

**Fortsetzung Tabelle 28: Umwandlungs- und Abbauprodukte von CEF, nach Literaturangaben**

m/z	Ion	Name	Struktur	Literatur
859	M <sub>2</sub> +H	DFC Di-mer		[286]
917	M <sub>2</sub> +K	DFC Di-mer		[273]

**Tabelle 29: Häufigkeit bestimmter Signale, die anhand des *spectral countings* für CEF als charakteristisch bestimmt wurden oder deren Masse in der Literatur als Abbauprodukt von CEF beschrieben wurden.**

Proben von Standards (Multistandard), Matrixkalibrierung und Wiederfindungsexperimenten wurden jeweils zusammengefasst, Feldproben sind einzeln und in Fettdruck aufgeführt

Wk: Weißkohl, P: Porree, BJ: junge Blattabschnitte bzw. Kopf, BA: alte Blattabschnitte bzw. äußere grüne Blätter, W: Wurzel, SG: Schweinegülle, GK: Hühnerkot, oD: ohne Dotierung, Z: Zwischenernte

Möglicherweise charakteristisches MS-Signal [m/z]	Proben Für Feldproben (Fettdruck) Anzahl der positiven MS-Spektren in Klammern	Anzahl positiver MS-Befunde			Retentionszeit* [min] Zeitfenster von 2 min
		Gesamt	davon in Proben mit		
			CEF	Multi-standard	
201	Multistandard Matrixkalib. Wk, P Wiederf. Wk, P, Puffer <b>Wk-BJ-oD (5)</b> <b>P-BJ-oD (4)</b> <b>Wk-W-SG-TC (9)</b> <b>Wk-BA-SG-AMO (2)</b>	413	85	192	10,3



**Fortsetzung Tabelle 29: Häufigkeit bestimmter Signale, die anhand des *spectral countings* für CEF als charakteristisch bestimmt wurden oder deren Masse in der Literatur als Abbauprodukt von CEF beschrieben wurden.**

Proben von Standards (Multistandard), Matrixkalibrierung und Wiederfindungsexperimenten wurden jeweils zusammengefasst, Feldproben sind einzeln und in Fettdruck aufgeführt

Wk: Weißkohl, P: Porree, BJ: junge Blattabschnitte bzw. Kopf, BA: alte Blattabschnitte bzw. äußere grüne Blätter, W: Wurzel, SG: Schweinegülle, GK: Hühnerkot, oD: ohne Dotierung, Z: Zwischenernte

Mögli- cher-weise cha- rakte-ristisches MS-Signal [m/z]	Proben Für Feldproben (Fett- druck) Anzahl der positi- ven MS-Spektren in Klammern	Anzahl positiver MS- Befunde			Retentions- zeit* [min] Zeitfenster von 2 min
		Gesamt	davon in Proben mit		
			CEF	Multi- standard	
285	Wiederf. Wk, P <b>Wk-W-CEF-Z (16)</b> <b>P-W-CEF-Z (2)</b>	245	63	180	15,9
310	Matrixkalib. P Wiederf. Wk, P <b>P-BJ-oD (11)</b> <b>P-BJ-CEF (6)</b>	414	200	91	7,2
328	Wiederf. Wk, Puffer	50	50	0	7,5
357	Wiederf. Wk, P	28	28	0	18,2
396	Matrixkalib. Wk Wiederf. Wk, P <b>Wk-BJ-oD (45)</b> <b>Wk-BJ-CEF (2)</b> <b>P-BJ-oD (7)</b> <b>P-BJ-CEF (8)</b>	211	32	125	19,8
412	Wiederf. Wk, P, Puffer <b>Wk-BJ-oD (8)</b> <b>Wk-BJ-CEF (12)</b> <b>Wk-BA-CEF (5)</b> <b>Wk-W-CEF (2)</b> <b>P-BJ-oD (5)</b> <b>P-BJ-CEF (9)</b> <b>P-BA-CEF (6)</b> <b>P-W-CEF (3)</b>	184	171	0	17,6
413	Wiederf. Wk, P, Puffer <b>Wk-BJ-oD (3)</b> <b>Wk-BA-SG-TC (8)</b>	218	207	0	11,0
414	Wiederf. Wk, Puffer	33	33	0	14,7
429	Multistandard Wiederf. Wk, P, SG, Boden, Puffer <b>P-BJ-oD-Z (17)</b> <b>P-BA-oD-Z (6)</b>	525	412	90	13,0
430	Multistandard Wiederf. SG, Puffer	402	377	25	9,0

**Fortsetzung Tabelle 29: Häufigkeit bestimmter Signale, die anhand des *spectral countings* für CEF als charakteristisch bestimmt wurden oder deren Masse in der Literatur als Abbauprodukt von CEF beschrieben wurden.**

Proben von Standards (Multistandard), Matrixkalibrierung und Wiederfindungsexperimenten wurden jeweils zusammengefasst, Feldproben sind einzeln und in Fettdruck aufgeführt

Wk: Weißkohl, P: Porree, BJ: junge Blattabschnitte bzw. Kopf, BA: alte Blattabschnitte bzw. äußere grüne Blätter, W: Wurzel, SG: Schweinegülle, GK: Hühnerkot, oD: ohne Dotierung, Z: Zwischenernte

Mögli- cher-weise cha- rakte-ristisches MS-Signal [m/z]	Proben Für Feldproben (Fett- druck) Anzahl der positi- ven MS-Spektren in Klammern	Anzahl positiver MS- Befunde			Retentions- zeit* [min] Zeitfenster von 2 min
		Gesamt	davon in Proben mit		
			CEF	Multi- standard	
444	Multistandard Wiederf. Wk, P	138	109	20	15,4
456	Matrixkalib. P Wiederf. P, Wk <b>Wk-BJ-oD-Z (6)</b> <b>Wk-BJ-SG-TC (6)</b> <b>P-BJ-oD-Z (18)</b> <b>P-BJ-GK-oD (21)</b> <b>P-BA-oD-Z (8)</b> <b>P-BJ-SG-TC (14)</b> <b>P-BJ-GK-TC (14)</b> <b>P-BJ-SG-ENR (4)</b> <b>P-BA-SG-ENR (6)</b> <b>P-BJ-CEF (32)</b> <b>P-W-CEF (41)</b> <b>P-Setzling (16)</b>	378	73	172	16,8
469	Matrixkalib. Wk, P Wiederf. Wk, P, Puffer <b>Wk-BJ-GK-ENR (8)</b> <b>Wk-BJ-CEF</b>	295	225	60	21,0
487	Multistandard Matrixkalib. P Wiederf. Wk, P, Puffer <b>Wk-BA-CEF (2)</b>	460	312	148	5,2
524	Multistandard Matrixkalib. Wk, Boden Wiederf. Wk, P, SG, Boden <b>P-W-CEF (3)</b>	7415	1005	6410	15,9
540	CEF-Standard Wiederf. P, SG, Puffer <b>P-W-oD-Z (5)</b>	93	33	55	9,2
570	Matrixkalib. Wk, P Wiederf. Wk, P <b>Wk-BJ-SG-oD (22)</b>	178	41	109	6,6

**Fortsetzung Tabelle 29: Häufigkeit bestimmter Signale, die anhand des *spectral countings* für CEF als charakteristisch bestimmt wurden oder deren Masse in der Literatur als Abbauprodukt von CEF beschrieben wurden.**

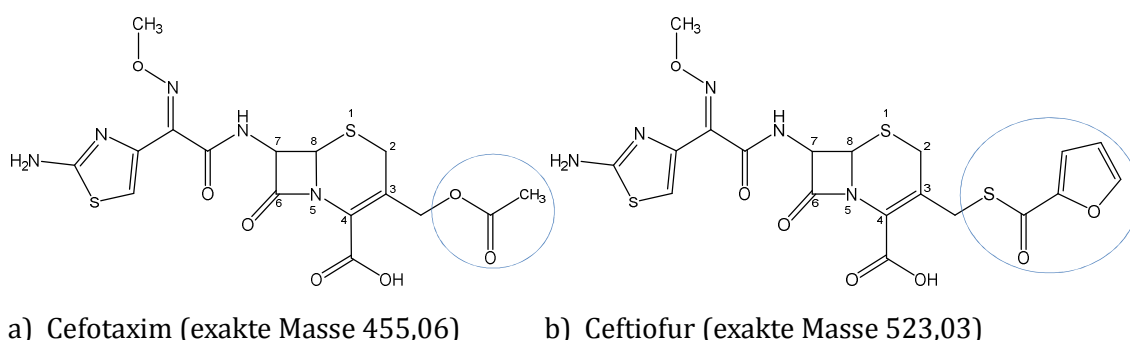
Proben von Standards (Multistandard), Matrixkalibrierung und Wiederfindungsexperimenten wurden jeweils zusammengefasst, Feldproben sind einzeln und in Fettdruck aufgeführt

Wk: Weißkohl, P: Porree, BJ: junge Blattabschnitte bzw. Kopf, BA: alte Blattabschnitte bzw. äußere grüne Blätter, W: Wurzel, SG: Schweinegülle, GK: Hühnerkot, oD: ohne Dotierung, Z: Zwischenernte

Mögli- cher-weise cha- rakte-ristisches MS-Signal [m/z]	Proben Für Feldproben (Fett- druck) Anzahl der positi- ven MS-Spektren in Klammern	Anzahl positiver MS- Befunde			Retentions- zeit* [min] Zeitfenster von 2 min
		Gesamt	davon in Proben mit		
			CEF	Multi- standard	
619	Matrixkalib. P Wiederf. Wk, P <b>P-BJ-oD (9)</b> <b>P-BJ-CEF (19)</b>	147	56	82	7,0
716	Wiederf. Wk, SG, Puffer <b>Wk-W-CEF-Z (11)</b>	142	50	92	15,4

*m/z* 456

Anhand des *spectral countings* soll die Masse *m/z* 456 spezifisch für Ceftiofur sein, die Literaturrecherche [293] ergab eine Übereinstimmung mit der Masse von **Cefotaxim**, einem weiteren Cephalosporin. CEF unterscheidet sich von Cefotaxim nur in einem Seitenrest, siehe Abbildung 38. Eine Substitution des Thiofuransäurerestes gegen eine Estergruppe ist unmöglich, um Cefotaxim aus CEF zu bilden. Somit ist es nicht plausibel, dass es sich bei der durch das *spectral counting* bestimmten spezifischen Masse um Cefotaxim handelt.

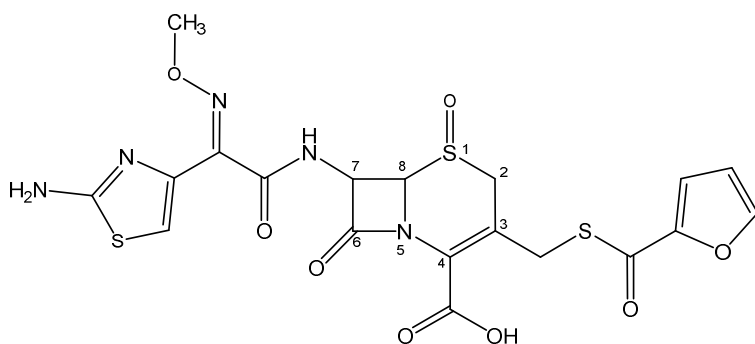


**Abbildung 38: Chemische Struktur von a) Cefotaxim- und b) Ceftiofurmoleküls. Die beiden Cephalosporine unterscheiden sich im Seitenrest**

In der Literatur wurden einige Massen als Umwandlungs- bzw. Abbauprodukte von CEF identifiziert, die gleichzeitig vermehrt in CEF-Proben auftraten. Möglicherweise handelt es sich hier um die gleichen Produkte. Im Folgenden werden diese Produkte beschrieben:

#### *m/z* 540

Lim *et al.* (2011) untersuchten den Abbau von CEF unter oxidierenden Bedingungen: Eine Lösung von CEF und Wasserstoffperoxid wurde für 4 h auf 50 °C erwärmt. Anschließend wurde die Lösung mit einem Acetonitril (ACN)/bidest. Wasser-Gemisch verdünnt und mittels LC-MS analysiert. Die Autoren identifizierten ein Oxidationsprodukt („ox-CEF“) mit *m/z* 540 (MH<sup>+</sup>) [287].



**Abbildung 39: Oxidiertes CEF, „ox-CEF“ [287]**

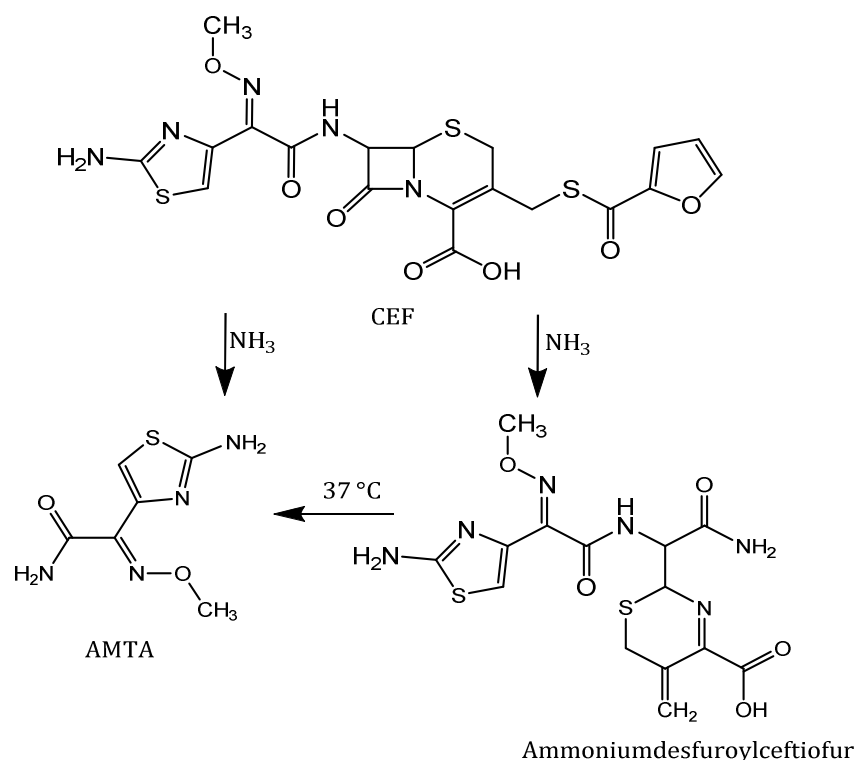
Das Produkt (Abbildung 39) tritt als Isomer auf, beide Retentionszeiten liegen dicht beieinander und eluieren kurz vor CEF.

Beim *spectral counting* wurde die Masse *m/z* 540 in insgesamt 33 Spektren der CEF-Proben und in 93 Spektren aller Proben gemessen. Die Retentionszeit betrug 9,2 min und somit eluierte *m/z* 540 vor CEF. Die HPLC-Bedingungen in den in Tabelle 28 genannten Literaturstellen unterschieden sich von den in dieser Arbeit angewandten. Es wurde jedoch immer eine RP-(*reversed phase*) Chromatographie verwendet, so dass zumindest von einer gleichen Elutionsreihenfolge der Substanzen ausgegangen werden kann. Eine Aussage, wie groß der Unterschied zur Retentionszeit von CEF ist bzw. sein muss, kann nicht getroffen werden, denn jede Änderung am Laufmittelgradienten ändert auch die Retentionszeit.

Spektren, in denen *m/z* 540 detektiert wurde, treten in Proben von Wiederfindungsstudien aus Gülle, Porree und Puffer auf, sowie im CEF-Standard. Möglicherweise handelt es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Proben bei der Masse *m/z* 540 um das von Lim *et al.* (2011) beschriebene „ox-CEF“ [287].

*m/z* 201

Berendsen *et al.* (2009, 2012) beschrieben 2-Amino- $\alpha$ -(methoxyimino)-4-thiazolacetamid (**AMTA**) mit einer Masse von *m/z* 201 als Abbauprodukt von CEF [275, 292]. Jedoch wurde die Masse *m/z* 413 auch in einer TC-Feldprobe mit acht Spektren und mit drei Spektren in einer undotierten Probe detektiert.



**Abbildung 40: Bildung von AMTA aus CEF durch Zugabe von Ammoniak, modifiziert nach [275]**

Abbildung 40 zeigt die Struktur von AMTA und seine möglichen Bildungswege. CEF wurde nach der genannten Literaturstelle unter ammoniakalischen Bedingungen bei erhöhter Temperatur hydrolysiert. In dieser Arbeit wurden auch erhöhte Temperaturen genutzt ( $50^\circ\text{C}$ ), aber keine ammoniakalischen Bedingungen. Für *m/z* 201 konnten 85 Spektren in DFC-Standard-Proben und 192 Spektren in Proben aus Wiederfindungstudien mit Multi-standard aufgenommen werden. Das Signal *m/z* 201 wurde aber auch in AMO-Proben (86 Spektren) und in Gemüseproben ohne Dotierung (50 Spektren) detektiert. Somit ist mittels *spectral counting* keine eindeutige Zuordnung zum CEF gegeben.

### *m/z 413*

Neben AMTA entsteht unter den Reaktionsbedingungen auch **Ammoniumdesthiofuoylceftiofur**, welches eine Masse von  $m/z$  413 aufweist. Diese Masse konnte in 207 Spektren detektiert werden, die ausschließlich von Proben aus Wiederfindungsstudien von CEF und DFC in Porree, Weißkohl und Puffer stammen. Somit kann angenommen werden, dass die Masse  $m/z$  413 einem Umwandlungsprodukt von CEF bzw. DFC zuzuordnen ist.

Berendsen *et al.* (2009, 2012) verwendeten eine methanolhaltige mobile Phase für die HPLC, die Retentionszeiten ( $t_R$ ) lagen für CEF bei 9,9 min, für Ammoniumdesthiofuoylceftiofur ( $m/z$  413) bei  $t_R=6,5$  min und für AMTA ( $m/z$  201) bei 2,7 min. Die in dieser Studie registrierten Massenpeaks für  $m/z$  413 wurden bei  $t_R=11,0$  min detektiert und für  $m/z$  201 bei 10,3 min. CEF eluierte bei 15,9 min. Die von Berendsen *et al.* (2009, 2012) detektierten massenchromatographischen Signale traten in gleicher Elutionsreihenfolge auf, wie in den in dieser Arbeit untersuchten Gemüseproben. Daher kann angenommen werden, dass die eluierten Analyten auch in ihrer Polarität in etwa gleich sind. Anhand des Vergleichs der Retentionszeiten wird die Annahme gestützt, dass die detektierten Massen  $m/z$  201 und  $m/z$  413 in den Spektren der in dieser Arbeit analysierten Gemüseproben einen Hinweis auf die Umwandlung von CEF zum AMTA und Ammoniumdesthiofuoylceftiofur geben. Gegenständig zu AMTA spricht das *spectral counting* der Masse  $m/z$  413 auch für den Hinweis auf Ammoniumdesthiofuoylceftiofur.

### *m/z 412*

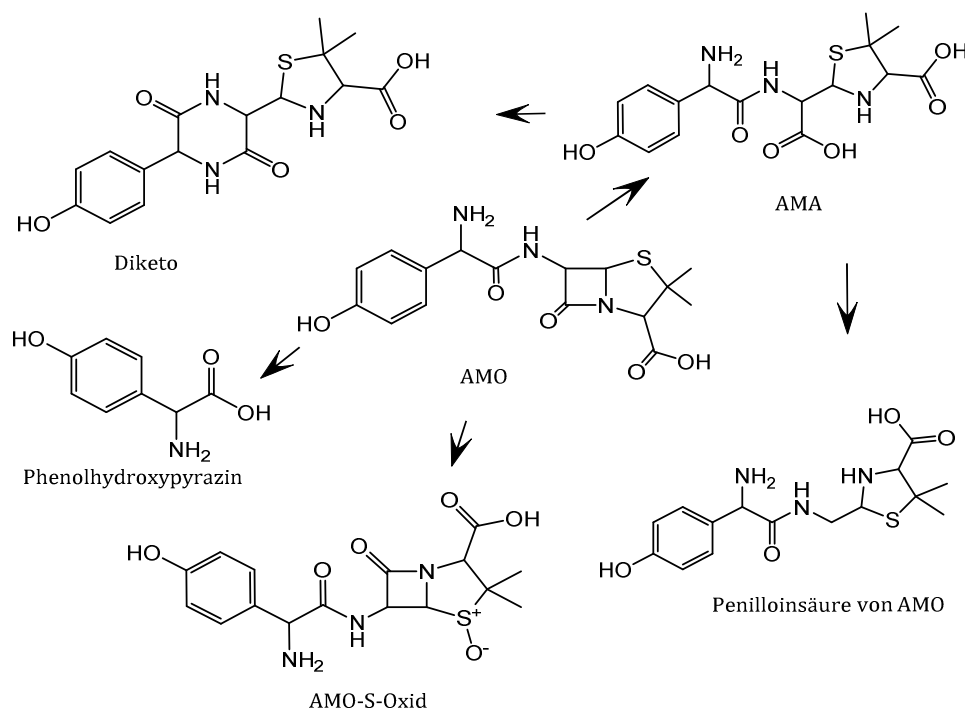
Jaglan *et al.* (1989) identifizierten **Desfuoylceftiofurthiolacton** als ein weiteres Umwandlungsprodukt von CEF, welches unter sauren Bedingungen durch Lactonisierung von DFC im HPLC-System (mobile Phase A, 100% hochreines Wasser mit 0,1% TFA; B, 90% Acetonitril mit 0,1%TFA) entsteht. Die Masse beträgt  $m/z$  412 und die Retentionszeit 14,5 min. DFC und CEF eluieren unter den vorliegenden HPLC-Bedingungen bei 15,8 min und 27,8 min [267]. Die Masse  $m/z$  412 wurde ebenfalls in 184 Spektren unserer Wiederfindungsproben sowie in Feldproben unserer Versuchsparzellen detektiert. Jedoch liegt die Retentionszeit mit 17,6 min hinter der von CEF (15,9 min) und DFC (8,3 min), so dass  $m/z$  412 höchstwahrscheinlich nicht Desfuoylceftiofurthiolacton repräsentiert.

### 5.3.4.3 AMO-Counting

Zur Erkennung massenspektrometrischer Hinweise auf Umwandlungs- und Abbauprodukte von AMO wurde analog zu Cefotiofur vorgegangen: Zunächst wurden die registrierten Massendaten nach AMO-Proben gefiltert, um eine begrenzte Auswahl zu treffen, danach wurde die Häufigkeit der Massen auf Spezifität für AMO untersucht.

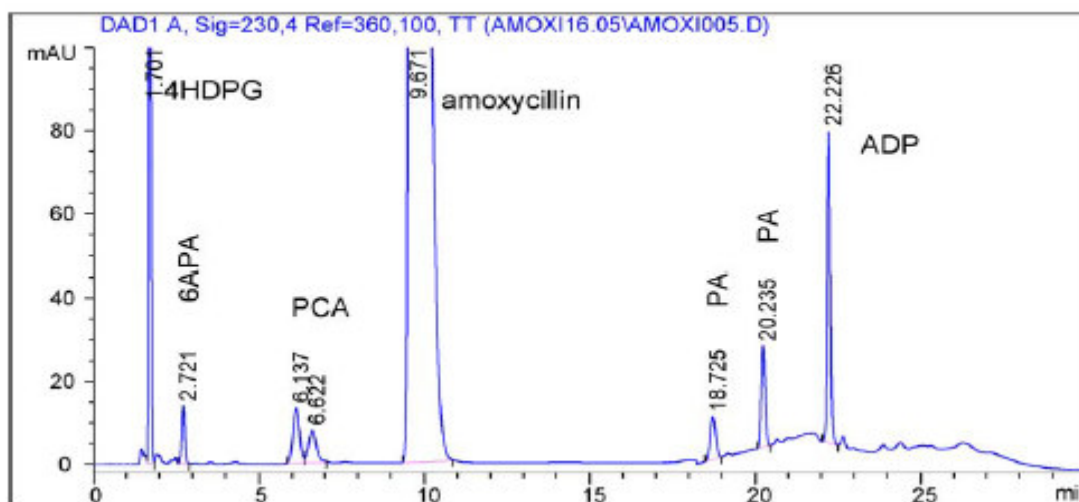
*In der Literatur werden folgende Abbauprodukte beschrieben:*

Gozlan *et al.* (2013) beschreiben fünf Abbauprodukte (Abbildung 41), die in verschiedenen wässrigen Lösungen aus AMO entstehen. AMO wurde in einer Konzentration von 100 µg/mL in Phosphatpuffern mit pH 5, 7 und 8 gelöst. Außerdem wurde in einem weiteren Ansatz der Phosphatpufferlösung bei pH 7  $Mg^{2+}$ - und  $Ca^{2+}$ -Ionen zur Unterstützung der Chelatbildung des AMO zugegeben. Gozlan *et al.* (2013) detektierten mittels LC-MS AMO ( $m/z$  366) und die Abbauprodukte AMA ( $m/z$  384), Diketo ( $m/z$  366), oxidiertes AMO (AMO-S-oxid) ( $m/z$  382), Penilloinsäure von AMO ( $m/z$  340) und Phenolhydroxypyrazin ( $m/z$  189). Außerdem detektierten sie jeweils das zugehörige Dimer. Zusätzlich konnten sie die Fragmente nach Ammoniakabspaltung für AMA, oxidiertes AMO (AMO-S-oxid), der Penilloinsäure und für AMO selber bereits im MS-Spektrum detektieren. Für die Chromatographie wurde ein Methanol/Wasser-Gradient verwendet. Der pH der Lösungen wurde auf pH 2,5 mit TCA eingestellt. Das Massenspektrometer war eine LCQ mit einer ESI-Quelle, die im Positivmodus verwendet wurde. Abbildung 41 zeigt vorgeschlagene Abbauwege von AMO [294].



**Abbildung 41: Abbauwege von AMO [294, 295]**

Auch Pérez-Lozano *et al.* (2006) detektierten neben AMA und Diketo von AMO, die Penilloinsäure von AMO, 4-Hydroxy-D-phenylglycin ( $m/z$  169) und 6-Aminopenicillansäure ( $m/z$  217) als Abbauprodukte von AMO. Sie untersuchten die Stabilität eines AMO-Granulats bei verschiedenen Temperaturen und Luftfeuchtigkeiten. Pérez-Lozano *et al.* (2006) nutzen für die HPLC einen Methanol/Phosphatpuffer-Gradienten bei pH 3 und einen DAD-Detektor. Abbildung 42 zeigt ein repräsentatives Chromatogramm [295].



**Abbildung 42: Abbauprodukte von AMO in einem Beispielchromatogramm [295].**

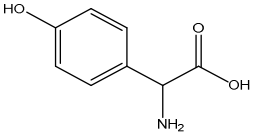
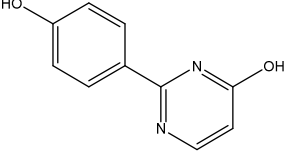
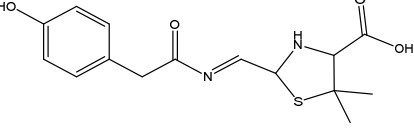
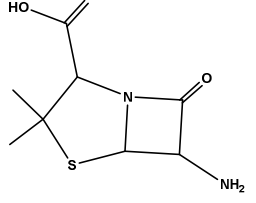
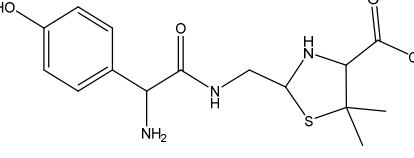
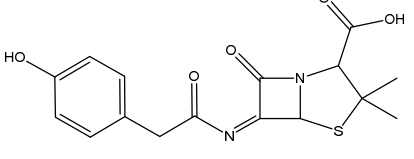
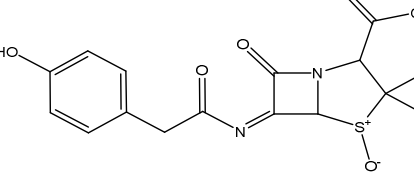
HPLC-DAD-Detektor, 230 nm. Mobile Phase: Phosphatpuffer pH 3/MeOH-Gradient  
 4HDPG: 4 Hydroxyphenylglycyl, 6APA: Aminopenicillansäure PCA: Penicilloinsäure von AMO, PA: Penilloinsäure von AMO, ADP: Diketo.

Nägele *et al.* (2005) untersuchten AMO unter sauren Bedingungen: 25 mg/mL AMO wurde zu gleichen Teilen mit 0,1 M HCL für 1 h bei Raumtemperatur vermischt. Sie detektierten AMO und die Abbauprodukte AMA, Diketo, Penilloinsäure von AMO und 4-Hydroxyphenylglylamoxicillin ( $m/z$  515,  $MH^+$ ). Es wurde ein ESI-TOF im Positivmodus und für die vorgeschaltete HPLC ein ACN/Wasser/10 mM Ammoniumformiat-Gradient verwendet [296].

Tabelle 30 fasst die oben beschriebenen Abbauprodukte zusammen.



**Tabelle 30: Umwandlungsprodukte von AMO, nach Literaturangaben**

m/z	Ion	Name, Beschreibung	Struktur	Literatur
169	M+H	4-Hydroxy-D-phenylglycin		[295]
189	M+H	Phenolhydroxypyrazin		[294]
323	M+H	desaminierte Penilloinsäure von AMO		[294]
217	M+H	6-Aminopenicillansäure		[295]
340	M+H	Penilloinsäure von Amo		[296]
349	M+H	desaminiertes AMO		[294, 297]
365	M+H	oxidiertes desaminiertes AMO (AMO-S-oxid - NH3)		[294]

**Fortsetzung Tabelle 30: Umwandlungsprodukte von AMO, nach Literaturangaben**

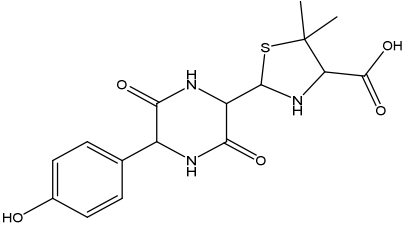
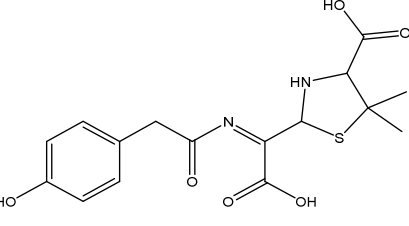
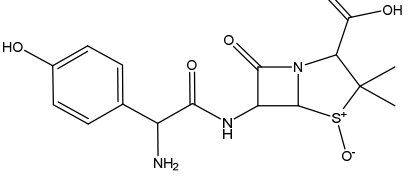
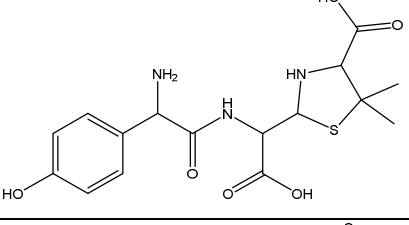
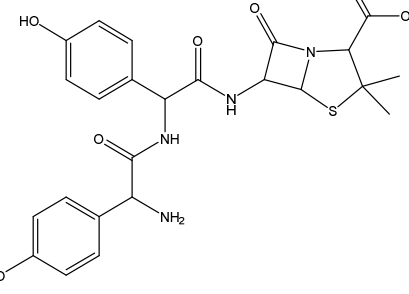
m/z	Ion	Name, Beschreibung	Struktur	Literatur
366	M+H	Diketo		[296]
367	M+H	desaminiertes AMA		[294]
382	M+H	oxidiertes AMO (AMO-S-oxid)		[284]
384	M+H	AMA		[296] [294]
515	M+H	4-Hydroxyphenylglyla- moxicillin		[296]

Tabelle 31 führt die Massen auf, die nach dem *spectral counting* vermehrt in AMO-Proben detektiert wurden.

**Tabelle 31: Häufigkeit bestimmter Signale, die anhand des spectral countings für AMO als möglicherweise charakteristisch ausgewählt oder/und deren Masse in der Literatur als Abbauprodukte von AMO beschrieben wurden.**

Proben von Standards (Multistandard), Matrixkalibrierungen und Wiederfindungsexperimenten wurden jeweils zusammengefasst. Feldproben sind einzeln aufgeführt.

Wk: Weißkohl, P: Porree, BJ: junge Blattabschnitte bzw. Kopf, BA: alte Blattabschnitte bzw. äußere grüne Blätter, W: Wurzel, SG: Schweinegülle, GK: Hühnerkot, oD: ohne Dotierung, Z: Zwischenernte

Möglicherweise charakteristi- sches MS-Signal [m/z]	Proben Für Feldproben (Fettdruck) Anzahl der positiven MS- Spektren-Befunde in Klam- mern	Anzahl positiver MS- Befunde			Retentions- zeit [min] Zeitfenster von 2 min
		Gesamt	davon in Proben mit		
			AMO	Multi- standard	
176	Multistandard Wiederf. Wk <b>Wk-BJ-GK-AMO (2)</b>	218	31	183	1,9
189	<b>P-BJ-SG-AMO (16)</b>	16	16	0	2,6
257	Wiederfindung Wk, P	28	18	10	8,5
259	AMO-Standard Wiederf. Wk, P	60	54	0	5,1
266	AMO-Standard mit NH <sub>3</sub>	63	61	2	22,0
291	AMO+Clavulansäure*- Standard Wiederf. P <b>P-BA-SG-oD (8)</b>	34	18	8	7,4
340	AMO-Standard Matrixkalib. Wk Wiederf. Wk, P, Boden, Puffer <b>P-BA-SG-AMO (4)</b> <b>Wk-W-CEF-Z (2)</b>	269	10	257	3,0
340	Bodenproben	263	11	150	6,1
349	Multistandard Matrixkalib. Wk, P, SG, Boden Wiederf. Wk, P, SG, Bo- den, Puffer <b>Wk-BA-SG-oD (2)</b> <b>P-BA-SG-AMO (2)</b> <b>P-BJ-GK-ENR (10)</b> <b>SG-AMO 2011 (32)</b> <b>SG-AMO 2012 (10)</b> <b>SG-CEF 2012 (6)</b>	11089	2187	8849	3,1
362	Multistandard Matrixkalib. SG Wiederf. P, SG <b>P-BA-SG-oD (8)</b> <b>P-BA-SG-ENR (7)</b> <b>SG-AMO 2011 (2)</b> <b>GK-AMO 2011 (11)</b>	418	268	125	2,9

**Fortsetzung Tabelle 31: Häufigkeit bestimmter Signale, die anhand des *spectral countings* für AMO als möglicherweise charakteristisch ausgewählt oder/und deren Masse in der Literatur als Abbauprodukte von AMO beschrieben wurden.**

Proben von Standards (Multistandard), Matrixkalibrierungen und Wiederfindungsexperimenten wurden jeweils zusammengefasst. Feldproben sind einzeln aufgeführt.

Wk: Weißkohl, P: Porree, BJ: junge Blattabschnitte bzw. Kopf, BA: alte Blattabschnitte bzw. äußere grüne Blätter, W: Wurzel, SG: Schweinegülle, GK: Hühnerkot, oD: ohne Dotierung, Z: Zwischenernte

Möglich- erweise charakte- ristisches MS-Signal [m/z]	Proben  Für Feldproben (Fett- druck) Anzahl der positi- ven MS-Spektren-Befunde in Klammern	Anzahl positiver MS- Befunde			Retenti- onszeit [min] Zeitfens- ter von 2 min
		Gesamt	davon in Proben mit		
			AMO	Multi- stan- dard	
366	Multistandard Matrixkalib. Wk, P, SG, Bo- den Wiederf. Wk, P, SG, Boden, Puffer <b>Wk-BJ-GK-AMO (3)</b> <b>Wk-BJ-AMO-Z (8)</b> <b>SG-AMO 2011 (5)</b>	4223	1126	3011	3,2
367	Multistandard Matrixkalib. Wk, P, SG, Boden Wiederf. Wk, P, SG, Bo- den, Puffer <b>P-BA-SG-AMO (10)</b> <b>SG-AMO 2011 (19)</b> <b>SG-AMO 2012 (24)</b> <b>GK-AMO 2011 (22)</b> <b>SG-CEF 2012 (12)</b>	6671	1026	5633	2,8
384	Multistandard Matrixkalib. SG, Boden Wiederf. SG, Boden, Puffer <b>Wk-BJ-GK-AMO (2)</b> <b>SG-AMO 2012 (38)</b> <b>SG-CEF 2012 (11)</b>	1906	322	1564	2,8
396	Matrixkalib. Wk Wiederf. Wk <b>Wk-BJ-AMO-Z (34)</b> <b>Wk-BA-AMO-Z (32)</b> <b>Wk-BJ-CEF (2)</b> <b>P-BJ-CEF (2)</b> <b>BnE-P-SG-AMO (11)</b>	339	77	253	18,7
404	AMO-Standard <b>P-BJ-AMO (3)</b>	23	23	0	7,8
515	AMO-MeOH-Standard	4	4	0	10,4

\*Zusatz zur Hemmung der  $\beta$ -Lactamasen

### *Vergleich der Massen aus der Literaturrecherche und dem spectral counting:*

Werden nun die massenspektrometrischen Daten der in der Literatur beschriebenen Umwandlungsprodukte (siehe Tabelle 30 S.121) mit den Daten verglichen, die auch in AMO-Proben detektiert wurden, so ergeben sich bei den Massen  $m/z$  189, 340, 349, 367 und 515 Übereinstimmungen. Zu den Massen  $m/z$  362 und 404 wurde auch ein Vorschlag zur qualitativen Zuordnung entwickelt. Als erste Plausibilitätsprüfung der gefundenen Hinweise wurden im Wesentlichen zwei Fragen beantwortet:

- Liegt neben der Übereinstimmung der Massen auch eine Überstimmung der Retentionszeiten relativ zu AMO, AMA Diketo vor?
- Treten die „diagnostischen“ Massen exklusiv in Proben auf, die AMO enthalten bzw. enthalten können (AMO-Standard, Proben der Wiederfindungsexperimente, Proben der AMO-Parzellen der Feldversuche)?

Da für die detektierten Massen keine MS/MS-Spektren zur näheren Charakterisierung vorlagen, wurde diese nur dann als Hinweis auf ein AMO-Umwandlungsprodukt gewertet, wenn sie ausschließlich bei den Pflanzen- oder Gülleproben der AMO-dotierten Varianten auftraten.

#### *$m/z$ 189*

In 16 Spektren einer Feldprobe von jungen Blattabschnitten des Porrees wurde  $m/z$  189 bei  $t_R=2,6$  min detektiert. Die Porreeparzelle war mit Schweinegülle gedüngt worden, die zuvor mit AMO dotiert worden war. Es handelte sich um eine Probe aus dem Feldversuch 2011. Möglicherweise enthielt diese Probe **Phenolhydroxypyrazin** (Struktur siehe Abbildung 41). Gozlan *et al.* (2013) beschrieben Phenolhydroxypyrazin mit einer Masse von  $m/z$  189 [294].

#### *$m/z$ 340*

In der Literatur [296] wird die Masse  $m/z$  340 als zugehörig zur **Penilloinsäure von AMO** beschrieben (siehe Tabelle 27). In dieser Arbeit konnte diese Masse bei zwei verschiedenen Retentionszeiten ( $t_R=3,0$  und  $6,1$  min) detektiert werden (siehe Tabelle 31). Bei  $t_R=3,0$  min wurde die Masse  $m/z$  340 in 269 Spektren detektiert, die zum größten Teil zu Wiederfindungsproben aus Boratpuffer oder Boden gehörten. Überwiegend wurde die Masse im Effluat bzw. Waschschrift der vorhergehenden SPE detektiert (125 Spektren). Die Retentionsreihenfolge AMA,  $m/z$  340, AMO, Diketo stimmt mit den Literaturangaben (AMA 2,4 AMO 4,5, Penilloinsäure 7,5 Diketo 10,5 min) überein. Die Masse  $m/z$  340 tritt in vier Spek-

tren einer Porreeprobe, die mit AMO-dotierter Schweinegülle gedüngt wurde, auf. Außerdem tritt sie in zwei Spektren von Weißkohlwurzeln einer CEF-dotierten Parzelle auf. Somit ist es zweifelhaft, dass die detektierte Masse der Penilloinsäure entstammt.

Bei  $t_R=6,1$  min wurde die Masse ebenfalls in 263 Spektren detektiert. Es handelte sich hier ausschließlich um Bodenproben, so dass es möglich ist, dass die hier detektierte Masse  $m/z$  340 zu einem nicht identifizierten Bodenbestandteil gehört.

#### *$m/z$ 362*

In 268 Spektren von AMO-Proben wurde die Masse  $m/z$  362 detektiert, was der Masse vom **Natriumaddukt der Penilloinsäure von AMO** entspricht. Diese Masse eluiert bei einer Retentionszeit von 2,9 min, also in etwa bei der Retentionszeit (3,0 min) der Masse  $m/z$  340, welches auch die Masse von Penilloinsäure ist. Natriumaddukte,  $[MNa]^+$ -Ionen entstehen in der Quelle des Massenspektrometers während des ESI-Vorgangs. Aber, wie schon zuvor bei  $m/z$  340, konnte die Masse  $m/z$  362 auch in AMO-freien Proben detektiert werden, außerdem auch in sieben bzw. acht Spektren in Proben von Parzellen ohne und mit ENR-Dotierung. Daher ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass es sich bei der detektierten Masse  $m/z$  362 um das Natriumaddukt der Penilloinsäure von AMO handelt.

#### *$m/z$ 349*

Die Masse  $m/z$  349 wurde vermehrt in AMO-Proben detektiert: Sie tritt in 2187 Spektren in AMO-Proben und in 53 Spektren in anderen „nicht-AMO“-Proben auf. Am häufigsten (8849 Spektren) wurde die Masse in Standardproben und Wiederfindungsproben, die mit Multistandard dotiert worden waren, detektiert. **Desaminiertes AMO** mit einem  $m/z$ -Verhältnis von 349 (Struktur siehe Tabelle 30, S.121), wurde als Abbauprodukt von AMO beschrieben, ohne Angabe von Retentionszeiten [294, 297]. Da die Masse auch in Nicht-AMO-Feldproben auftrat, ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei der detektierten Masse um desaminiertes AMO handelt.

#### *$m/z$ 367*

In 5633 Spektren von Multistandard-Proben wurde die Masse  $m/z$  367 bei  $t_R=3$  min detektiert, aber auch in zehn Spektren von Feldproben, wie z.B. in alten Blattabschnitten des Porrees der Versuchsparzelle aus 2011, die mit AMO-dotierter Schweinegülle gedüngt worden war. Gozlan *et al.* (2013) beschrieben  $m/z$  367 als  $[MH-NH_3]^+$ -Fragment von AMA, Dieses **desaminierte AMA** tritt bereits im MS-Spektrum auf. Eine Retentionszeit gaben sie nicht an. Die Abspaltung von Ammoniak führt zur Masse  $m/z$  367 (siehe Tabelle 30) [294]. Diese

Abspaltung erfolgt während der Fragmentierung zur Aufnahme des MS/MS-Spektrums, kann aber auch schon in der Quelle erfolgen, so dass die Masse  $m/z$  367 im Vorläuferionenscan aufgenommen wird. Die Masse wurde auch in einer CEF-Feldprobe detektiert, so dass es fraglich bleibt, ob es sich bei der hier detektierten Masse  $m/z$  367 um desaminiertes AMA handelt.

#### *$m/z$ 404*

Mit 23 Spektren und einer Retentionszeit von 7,8 min wurde die Masse  $m/z$  404 in AMO-Standardproben und jungen Blattabschnitten des Porrees einer AMO-Parzelle detektiert. Das **Kaliumaddukt von AMO** hat eine Masse von  $m/z$  404, Literaturdaten hierzu sind nicht bekannt. Das Kaliumaddukt bildet sich anstatt des  $M+H$ -Ion in der Ionenquelle beim ESI-Prozess, somit wird es zur selben Zeit wie AMO, bei 3 min den Detektor erreichen. Bei der detektierten Masse von  $m/z$  404 wird es sich daher nicht um das Kaliumaddukt von AMO handeln, da die Retentionszeit nicht übereinstimmt.

#### *$m/z$ 515*

In insgesamt vier Spektren des AMO-MeOH-Standards tritt die Masse  $m/z$  515 bei einer Retentionszeit von 10,4 min auf. Nägele und Moritz (2005) [296] detektierten **4-Hydroxyphenylglylamoxicillin** ( $m/z$  515, Struktur siehe Tabelle 30, S.121) bei einer Retentionszeit von 9,4 min, Diketo bei 10,5 min und AMO bei 4,5 min, somit eluiert 4-Hydroxyphenylglylamoxicillin vor Diketo und nach AMO. Die Retentionsreihenfolge AMO - 4-Hydroxyphenylglylamoxicillin - Diketo stimmt mit der in dieser Arbeit (AMO (3 min) - Diketo (6 min) -  $m/z$  515 (10 min)) nicht überein, so dass die in dieser Arbeit detektierte Masse  $m/z$  515 nicht 4-Hydroxyphenylglylamoxicillin zugeordnet werden kann.

#### 5.3.4.4 Fazit

Durch Anwendung der *spectral counting*-Methode wurden einige Massen-Signale in Spektren von Gemüseproben als möglicherweise charakteristisch für Abbau- bzw. Umwandlungsprodukte des AMO und CEF bewertet.

In Massenspektren der folgenden Gemüseproben aus den Vegetationsperioden 2011 und 2012 ließen sich Hinweise auf den applizierten Wirkstoff AMO und dessen Abbauprodukt Phenolhydroxypyrazin [294] finden:

- **AMO:** **Weißkohl** junge Blätter (Düngung Hühnerkot)
- **Phenolhydroxypyrazin:** **Porree** junge Blätter (Düngung Schweinegülle)

Die Signalintensitäten für AMO sind allerdings sehr gering, so dass in den vorhergehenden LC-MS/MS-Analysen der Ernteproben keine eindeutige Identifizierung und Quantifizierung möglich war.

Die Bewertung der *spectral counting*-Hinweise auf den desaminierten Wirkstoff AMO/-NH<sub>3</sub> und den desaminierten Metaboliten Penicilloinsäure (AMA/-NH<sub>3</sub>) ist aufgrund gleicher Befunde in den CEF-Gülleproben unsicher. Die nachgewiesene Bildung von AMA aus AMO in Boden und Gülle (Abbildung 37) bestärkt aber den Verdachtsbefund der desaminierten Umwandlungsprodukte in Pflanzen.

In den Proben der Wiederfindungsstudien der Ceftiofuranalytik konnte ein Hinweis auf das CEF-Umwandlungsprodukt Ammoniumdesthiofuroylceftiofur (m/z 413) festgestellt werden. Weiterhin lag in den Wiederfindungsproben und auch in einigen CEF-Standardproben ein Hinweis auf oxidiertem CEF (ox-CEF, m/z 540) vor.

In Gemüseproben, die von Ceftiofur-gedüngten Parzellen stammen, sind Hinweise auf ein MS/MS-Fragment von CEF (m/z 285), DCA (m/z 487) und CEF (m/z 524) auffällig. In folgenden Feldproben konnten die entsprechenden Massen nachgewiesen werden:

- **MS/MS-Fragment (m/z 285):** **Porree** Wurzeln, (Zwischenernte)  
**Weißkohl** Wurzeln, (Zwischenernte)
- **DCA:** **Weißkohl** alte Blätter
- **CEF:** **Porree** Wurzeln

Analog zu den AMO-Befunden, waren zuvor in den Gemüseproben auch keine quantifizierbaren massenspektrometrischen Daten des Wirkstoffes Ceftiofur detektiert worden.

Offenkundig bietet die Methode des *spectral counting* weiterführende strukturanalytische Ansätze um die Negativ-Befunde sowohl für die  $\beta$ -Lactam-Wirkstoffe AMO und CEF als auch deren Hauptmetaboliten im Gemüse der Feldversuche zu deuten. In Folgeprojekten lassen sich evtl. die vorgeschlagenen Verdachtsbefunde verifizieren oder falsifizieren.



### 5.3.6 Mikrobiologische Untersuchungen 2012

2012 wurde CEF statt TC im Feldversuch verwendet, somit konnten neben AMO die Auswirkungen eines weiteren  $\beta$ -Lactams untersucht werden. Dies war von Interesse, denn CEF zeigt gegenüber AMO eine größere selektive Wirkung für ESBL-produzierende *E. coli* [23].

Die Probennahme erfolgte in gleicher Weise wie 2011. Pro Parzelle wurden 5 Pflanzen geerntet. Die Pflanzen wurden getrennt nach Wurzel und inneren Blättern analysiert.

Zu Beginn der Analyse wurden die Wurzeln und Blätter in Alkohol geschwenkt, so dass eine oberflächliche Kontamination von Mikroorganismen ausgeschlossen werden konnte. Die Blattabschnitte vom Porree sowie die Weißkohlblätter wurden zusätzlich ohne vorherige Alkoholbehandlung analysiert. Die weitere Vorgehensweise an der FU-Berlin entsprach der aus 2011 (siehe Kapitel 5.2.3, S.82).

Vor der Pflanzung und Begüllung wurden die Setzlinge, die Erde, in der die Setzlinge angezchtet worden waren, die noch undotierte Schweinegülle und der Boden beprobt.

Die mikrobiologischen Untersuchungen ergaben, dass die Setzlinge und deren Pflanzerde frei von resistenten Bakterien (ESBL und PMQR) waren. Die Schweinegülle wies jedoch bereits ESBL und PMQR produzierende Bakterien auf. Auch in einigen Bodenproben (Weißkohlparzellen mit AMO- und CEF-Dotierung), die vor der Düngung genommen wurden, waren ESBLs.

In den Pflanzenproben der Zwischenernte im Juli wurden bei einer Porreepflanze (Parzelle ohne Antibiotika-Dotierung) ESBLs nachgewiesen, die Probe, die mit Alkohol behandelt wurde, war negativ. Im Boden konnten die ESBLs auch nachgewiesen werden. Eine Bodenprobe einer weiteren Parzelle (Porree CEF) zeigte einen positiven ESBL-*E. coli*-Befund, jedoch wurden in der entsprechenden Pflanzenprobe keine ESBL-*E. coli* nachgewiesen. Andere Bakterien, wie ubiquitär vorkommende *Acinetobacter* oder *Pseudomonas* wurden sowohl in Porree und Weißkohl als auch im Boden nachgewiesen (siehe Tabelle 32).

Nach der Beerntung im September wurden sowohl aus dem Boden der unterschiedlich mit Gülle beaufschlagten und Antibiotika-dotierten Versuchspartzen als auch aus Gemüsepflanzen zahlreiche ESBL-produzierende *E. coli* isoliert. Im Unterschied zur Zwischenernte wurden überwiegend *Enterobakter* isoliert. Die Befunde an *E. coli* sind deutlich zurückgegangen. Bemerkenswert ist der ESBL-Befund in essbaren Teilen des Porrees.

**Tabelle 32: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen zu Beginn der Anbauperiode 2012**

Probe		ESBL vorhanden ?	Isolierte ESBL produzierende Mikroorganismen	Fluorchinolon-resistenz vorhanden ?	Isolierte Fluorchinolon-resistente Mikroorganismen
Gülle original		positiv	<i>E. coli</i>	positiv	
Setzlinge Porree		negativ		negativ	
Setzlinge Weißkohl		negativ		negativ	
Erde Setzlinge Porree		negativ		negativ	
Erde Setzlinge Weißkohl		negativ		negativ	
Boden vor Düngung	Porree	ohne Antibiotikadotierung	negativ	negativ	
		AMO	negativ	negativ	
		ENR	negativ	negativ	
		CEF	negativ	negativ	
	Weißkohl	ohne Antibiotikadotierung	negativ	negativ.	
		AMO	positiv	<i>E. coli</i>	negativ
		ENR	negativ	negativ	
		CEF	positiv	<i>E. coli</i>	negativ

**Tabelle 33: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen der Anbauperiode 2012, Zwischenernte**

Probe				Isolierte Mikroorganismen	
				ESBL-produzierend	Fluorchinolonres.
Zwischenernte	Porree	Parzelle <b>ohne Dotierung von Antibiotika</b>	Stange ohne Alkoholbehandlung	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
			Boden	<i>E. coli</i>	
		Parzelle mit <b>CEF</b> -dotierter Gülle	Boden	<i>E. coli</i>	
		Parzelle mit <b>AMO</b> -dotierter Gülle	Boden	<i>E. coli</i>	
	Weißkohl	Parzelle mit <b>CEF</b> -dotierter Gülle	Boden	<i>E. coli</i>	

**Tabelle 34: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen der Anbauperiode 2012, Ernte**

Probe				Isolierte Mikroorganismen	
				ESBL-produzierend	Fluorochinolonres.
Ernte	Porree	Parzelle mit ENR-dotierter Gülle	Stange mit vorheriger Alkoholbehandlung	<i>Enterobacter ludwigii</i>	
			Boden	<i>E. coli, Pseudomonas</i>	
	Weißkohl	Parzelle mit CEF-dotierter Gülle	Wurzel immer mit vorheriger Alkoholbehandlung	<i>Enterobacter, Pseudomonas citronellolis</i>	
		Parzelle ohne Dotierung von Antibiotika	Kopf ohne Alkoholbehandlung	<i>Enterobacter ludwigii</i>	
			Wurzel immer mit vorheriger Alkoholbehandlung	<i>Enterobacter, Enterobacter cloacea</i>	
		Parzelle mit CEF-dotierter Gülle	Wurzel immer mit vorheriger Alkoholbehandlung	<i>E. coli, Enterobacter cloacea</i>	
			Boden	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
		Parzelle mit AMO-dotierter Gülle	Wurzel immer mit vorheriger Alkoholbehandlung	<i>Enterobacter, E. coli, Enterobacter, Enterobacter cloacea</i>	<i>E. coli</i>

Allem Anschein nach überlebten im Feldversuch 2012 die zur Gülle dotierten ESBL-Bakterien im Boden die fünfmonatige Anbauperiode von der Düngung bis zur Ernte. Auch in anderen Studien konnten antibiotikaresistente Bakterien oder die entsprechenden Gene nach Güllebeaufschlagung im Boden gefunden werden [92, 95, 97–99]. Es kann ein Zusammenhang zwischen dem Antibiotikagehalt der Gülle und den detektierten resistenten Mikroorganismen hergestellt werden [92]. Weiterhin wurde festgestellt, dass in Güllebeaufschlagten Böden die Selektion von Antibiotikaresistenzen signifikant erhöht wird [28, 261]. Die Resistenzen sind auch nach mehreren Monaten im Boden wiederzufinden [298, 299], was durch die Feldversuche 2011 und 2012 bestätigt wird. Rahube *et al.* (2012) mutmaßten, dass die lange Tenazität der Resistenzplasmide durch die Aufnahme in Bodenbakterien begründet sein kann [299]. Die gleiche Aussage trafen Dantas und Sommer (2015) [70]. Plasmide können mobilisiert und dann durch Konjugationsmechanismen auf andere Bakterien, auch artfremde, übertragen werden. Weiterhin können sich die Gene aufgrund

der Anwesenheit von mobilen Elementen durch Transposition verbreiten [299]. Möglicherweise nahmen im Feldversuch 2012 die zur Ernte vermehrt gefundenen *Enterobakter* die Resistenzgene der *E. coli*-Bakterien auf.

Dantas und Sommer (2015) folgerten, dass Nutztiere durch das Erdreich mit Bodenbakterien in Kontakt kommen können, so dass diese ihre potentiell resistenztragenden Erbanlagen an die Mikroflora der Tiere zurückgeben können [70]. Aminov *et al.* (2001, 2002) sowie Chee-Sanford *et al.* (2001) stimmen bei ihren Untersuchungen darüber überein, dass Resistenzgene gegen Tetracycline durch die Landwirtschaft in die Umwelt und schließlich auch in das Grund- und Trinkwasser gelangen [97–99]. Resistenzgene werden als „Schadstoffe“ einer potentiellen Gefahrenquelle für Lebensmittel und damit für den Menschen am Ende der Nahrungsmittelkette angesehen [92, 261].

Offensichtlich bilden belastete Nutzpflanzen einen möglichen Eintragspfad für antibiotikaresistente Bakterien durch Lebensmittel pflanzlicher Herkunft, wie die Feldversuche 2011 und 2012 zeigen. Die Ergebnisse erlauben keine Differenzierung zwischen einer äußeren- oder endophytischen, inneren Belastung der Pflanzen durch Bakterien. Bemerkenswert ist, dass Yang *et al.* (2013) ein gehäuftes Auftreten von antibiotikaresistenten endophytischen Bakterien im Sellerie beobachteten, der auf organisch gedüngtem Boden gewachsen war. Sie schlossen auf einen Zusammenhang mit dem möglicherweise hohen Frachten an Antibiotika, die durch die Gülledüngung ausgebracht worden waren [300].

Organisch gedüngter Boden stellt somit ein Reservoir für multiresistente Mikroorganismen dar, welches zum Eintrag antibiotischer Resistenzen in die Umwelt und in die Nahrungsmittelkette beitragen kann.

## 5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse des Feldversuchs 2012 und ergänzender Untersuchungen – Fazit

Die Durchführung des Feldversuches verlief auch im Jahr 2012 erfolgreich, da die Pflanzen gut gewachsen waren und somit genügend Material zur Ernte und anschließenden Analyse zur Verfügung stand. Aufgrund des feuchteren Frühsommers, besonders zum Zeitpunkt der Gülledüngung und Pflanzung, musste nicht bewässert werden. Des Weiteren wirkte das Kohlnetz, so dass keine Insektizide, aber Fungizide zum Einsatz kamen. Wie auch bei der Pflanzenernte 2011, konnte 2012 erneut ENR in den Pflanzen detektiert werden. Dieses Mal wurde auch in den Wurzeln ENR quantifiziert, zur Zwischenernte mit 2,0 µg/kg FG für Porree und 1,7 µg/kg FG im Weißkohl. Im Weißkohlkopf bzw. in den jungen Blättern des Porrees blieb der ENR-Gehalt unterhalb der Bestimmungsgrenze. Einige Monate später zur Ernte

hatten sich die ENR-Konzentrationen in den Wurzeln beider Pflanzenarten auf 0,5 µg/kg FG verringert. In den oberirdischen Pflanzenteilen waren keine Rückstände mehr nachweisbar. Ursache für den Rückgang der ENR-Gehalte könnte sein, dass das Fluorchinolon während der Wachstumszeit in den oberen Bodenschichten zunehmend sorbiert wurde [204], so dass es von den Wurzeln der gereiften Pflanzen nicht mehr nachweisbar aufgenommen wurde. Außerdem könnte die verminderte Nährstoffaufnahme vor dem Erntezeitpunkt zu einer geringeren Antibiotikaaufnahme führen [218, 227, 228].

Die Vermutung, dass die geringen Rückstandsbefunde aus 2011 durch die Rillenbegüllung verursacht wurden, ließ sich durch die erneut niedrigen Befunde in 2012 nicht bestätigen. Werden die Ergebnisse der Feldversuche 2011 und 2012 mit den Ergebnissen der Rotkohlstudie im Feldversuch 2010 in Köln-Auweiler [21] verglichen, fallen deutliche Unterschiede auf, obwohl in vorangegangenen Hydrokulturversuchen die beiden Kohlsorten keine auffälligen Unterschiede in der Antibiotikaaufnahme (2–12 mg/kg ENR bei Weißkohl und 2–15 mg/kg ENR bei Rotkohl) zeigten [19, 21]. In den Ernteproben der Feldversuche waren in Rotkohlköpfen erheblich höhere ENR-Gehalte (zwischen 9 und 17 µg/kg FG) nachzuweisen als in Weißkohl und Porree aus dieser Studie (max 2 µg/kg). Nachfolgend werden mögliche Begründungen für die unterschiedlichen Rückstandsbefunde in Weißkohl, Porree und Rotkohl aufgeführt.

Der Rotkohl wurde mit Schweinegülle gedüngt, die mit 50 bzw. 150 mg/L CTC und ENR gleichzeitig dotiert worden war. Ob die Gegenwart des Chlortetracyclins zur relativ hohen Aufnahme an ENR beigetragen hat, ist nicht geklärt. Des Weiteren unterschieden sich die Umweltbedingungen bei den Versuchsfeldern im Rheinland und in Westfalen: Das Rheinland ist im Klima etwas milder als die Soester Börde, so dass die Pflanzen im Rheinland ca. 1 Woche eher im Wachstum sind. Der Anbau des Rotkohls 2010 in Köln-Auweiler erfolgte auf einem „sandigen, schluffigen Lehm Boden“, der zu 43% aus Schluff bestand [240]. Auf den Versuchspartzellen in Soest, d.h. in den Feldversuchen 2011 und 2012, wurden Weißkohl und Porree ebenso auf einem sandigen schluffigen Lehm Boden angebaut, aber mit einem deutlich höheren Schluffanteil von 70%. Ein höherer Schluffanteil bedeutet mehr Sorptionsplätze, die in der Bodenmatrix zur Verfügung stehen. Diese können von Antibiotika besetzt werden, sind also im Boden immobilisiert und nicht mehr ausreichend pflanzenverfügbar. Es sei denn, sie werden durch äußere Einflüsse wieder desorbiert, beispielsweise durch mit mineralischen Düngern eingebrachte Ionen, die um die Sorptionsplätze konkurrieren.

Gemäß Trapp *et al.* (2010) ist die Pflanzenverfügbarkeit für ein Antibiotikum von der Beschaffenheit des Bodens, der Pflanzenart und den Umweltbedingungen abhängig [301]. Auch Carter *et al.* (2014) schlussfolgerten, dass die Aufnahme von chemischen Stoffen in

Pflanzen ein komplexer Prozess ist, der durch eine Kombination aus Boden, Pflanze und chemischen Faktoren gelenkt wird [302].

In den zuvor im Arbeitskreis durchgeführten Hydrokulturversuchen zeigten Porree und Weißkohl eine deutliche Aufnahme von ENR, CIP und TC [19]. Das Potential von Porree und Weißkohl, Antibiotika aufzunehmen, insbesondere ENR, wurde auch im hier durchgeführten Feldversuch festgestellt, jedoch lag hier nur eine Aufnahme in Spuren vor. Für AMO und dessen Umwandlungsprodukte konnte in Hydrokultur keine Pflanzenaufnahme nachgewiesen werden. Auch die Ergebnisse der Rückstandsanalytik der Feldproben zeigten keinerlei Rückstände an AMO, CEF und den Umwandlungsprodukten AMA und Diketo von AMO, sowie DFC und DCA.

Aufgrund der schlechten Wiederfindung der  $\beta$ -Lactame wurden Sorptionsstudien von AMO sowie dessen Umwandlungsprodukten in Gülle- und Bodenproben in Abhängigkeit von der Reaktionszeit durchgeführt (siehe Kapitel 5.3.3 S.104). Diese Experimente ließen auf einen hohen Sorptionsgrad schließen und einen schnellen Abbau von AMO bei gleichzeitiger Bildung von AMA. Diketo konnte nicht nachgewiesen werden. CEF wurde im Vergleich zu AMO in höheren Konzentrationen wiedergefunden, jedoch gab es auch hier deutliche Hinweise auf Sorptions- oder Abbaureaktionen.

Für die rückstandsanalytische Bestimmung von CEF wurde die beschriebene Derivatisierung über DFC zu DCA (siehe Kapitel 5.3.1 S.90 und [265, 266]) für die in dieser Studie untersuchten Boden- und Gemüseproben angewendet, jedoch war in den Feldproben keiner dieser Komponenten detektierbar.

Um neben sorptiven Effekten und bekannten Umwandlungsreaktionen weitere Hinweise zum Verbleib der eingesetzten  $\beta$ -Lactame in den Feldversuchen zu erhalten, wurde eine detaillierte Auswertung der massenspektrometrischen Daten mittels „*spectral counting*“ durchgeführt. Dies führte zu Hinweisen auf Umwandlungs- und Abbauprodukte von AMO und CEF in Pflanzen, Boden und Gülle. So konnten Hinweise auf AMO im Weißkohlkopf (Düngung Hühnerkot) und Phenolhydroxypyrazin [294] im Porree (Düngung Schweinegülle) erhalten werden. Weiterhin wurden die Massen des desaminierten Wirkstoffs (AMO/-NH<sub>3</sub>) [294, 297] und des desaminierten Metaboliten Penicilloinsäure (AMA/-NH<sub>3</sub>) [294] in Weißkohlblättern, Porree und Schweinegülle und Hühnerkot detektiert, jedoch bleibt die stoffliche Zuordnung auf die Umwandlungsprodukte unsicher. Die nachgewiesene Bildung von AMA aus AMO in Boden und Gülle (Abbildung 37) bestärkt wiederum den Verdachtsbefund an desaminierten Produkten in Pflanzen und Gülle.

Das *spectral counting* für Proben, die CEF enthalten bzw. enthalten können (Pflanzen der CEF-Parzellen, CEF-Standard, CEF-Proben aus Wiederfindungsexperimenten) ergab Hinweise auf Ammoniumdesthiofuroylceftiofur [275] in Proben von Wiederfindungsexperimenten. In diesen, wie auch in einigen CEF-Standardproben, wurden Hinweise auf oxidiertes CEF [287] gefunden. Zudem lagen Hinweise auf das CEF-MS/MS-Fragment  $m/z$  285 in Porree- und Weißkohlwurzeln der Zwischenernte vor, sowie CEF in Porreewurzeln und DCA in Weißkohlblättern der Ernteproben. Die Signalintensitäten waren für CEF, DCA und auch für das oben genannte AMO zu gering, so dass in den vorhergehenden LC-MS/MS-Analysen keine Identifizierung möglich war.

Die Methode des *spectral counting* kann offensichtlich für weiterführende strukturanalytische Fragestellungen eingesetzt werden, so dass die Negativ-Befunde sowohl für die  $\beta$ -Lactam-Wirkstoffe AMO und CEF als auch deren Hauptmetaboliten im Gemüse der Feldversuche einen Erklärungsansatz bieten. Folgeuntersuchungen müssten zeigen, ob sich die vorgeschlagenen Verdachtsbefunde verifizieren lassen..

Die mikrobiologischen Untersuchungen ergaben, dass sich sowohl aus dem Boden einiger Versuchspartzellen als auch aus vereinzelt Proben der Gemüsepflanzen resistente Mikroorganismen, darunter auch ESBL-*E. coli*, isolieren ließen. Zu Beginn des Feldversuchs (Probenahme vor der Dotierung der Gülle mit den resistenten Bakterien) konnten bereits in der Gülle sowie im Boden zweier Partzellen ESBL-*E. coli* nachgewiesen werden. Zur Zwischenernte wurden ESBL-*E. coli* in drei Porreepartzellen (ohne Antibiotika, CEF und AMO-Dotierung) und einer Weißkohlpartzelle (CEF-Dotierung) gefunden. Außerdem waren im Porree der Partzelle ohne Antibiotikadotierung ESBL-produzierende und Fluorchinolon-resistente *E. coli* nachzuweisen. Zwei Monate später zur Ernte lagen vor allem in den Wurzeln (Porree, CEF-Dotierung; Weißkohl, ohne Antibiotika-, CEF- und AMO-Dotierung) positive Befunde an ESBL-produzierenden *Enterobacter* vor. Im Boden der Porreepartzelle mit ENR-Dotierung sowie der Weißkohlpartzelle mit CEF-Dotierung, konnten ESBL-*E. coli*, nachgewiesen werden. In der Weißkohl-Partzelle waren gleichfalls Fluorchinolon-resistente *E. coli* vorhanden. Die Weißkohl-Partzelle (CEF-Dotierung) wies somit von Beginn bis Ende des Feldversuchs ESBLs auf, zum Zeitpunkt der Ernte kam der Befund der Flurochinolonresistenz hinzu. Bemerkenswert war auch der Nachweis von ESBLs im essbaren Teil des erntereifen Porrees (ENR-Dotierung).

Die zur Gülle dotierten ESBL-*E. coli* überlebten augenscheinlich im Boden die 5-monatige Anbauperiode bis zur Ernte. Möglicherweise nahmen die zur Ernte vermehrt gefunden *Enterobakter* die Resistenz der *E. coli*-Bakterien auf. Auch in anderen Studien konnten antibiotikaresistente Bakterien bzw. die entsprechenden Gene nach Güllebeaufschlagung im Boden gefunden werden [92, 95, 97–99]. Landwirtschaftlich genutzte Böden stellen somit ein

Reservoir für (multi-)resistente Mikroorganismen dar, die zum Eintrag antibiotischer Resistenzen in Lebensmittel beitragen können. So lässt sich auch den Ergebnissen der Rückstandsanalysen und mikrobiologischen Untersuchungen der Feldversuche entnehmen, dass Konsumenten von konventionell angebautem Gemüse sowohl Antibiotikarückständen als auch resistenten Keimen ausgesetzt sein können. Bereits Hamilton und Miller et al. (2001) schrieben, dass der britische Ausschuss für mikrobielle Sicherheit von Lebensmitteln (Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food) ungekochtes Gemüse für eine potentielle Quelle für resistente Pathogene hält [303]. Rahube et al. (2012) fordern eine Quantifizierung der Plasmide, die dazu beitragen soll, die Bedeutung von (Mehrfach-) Resistenzplasmiden als „Schadstoffe“ zu bestimmen, die, freigegeben in die Umwelt, das Potential haben, sich bis zu pathogenen Erregern beim Menschen zu verbreiten [299].

Ob es durch den Verzehr antibiotikahaltiger Gemüse zur vermehrten Bildung und Verbreitung von Resistenzen kommen kann, wird im Folgeprojekt RESET- II, Teilprojekt 7, im Rahmen von Fütterungsversuchen an Versuchstieren untersucht [32, 304].



## 6 Zusammenfassung \*

---

Mit tierischen Exkrementen aus der Nutztierhaltung, die als Wirtschaftsdünger eingesetzt werden, gelangen die nach Anwendung ausgeschiedenen Antibiotika-Wirkstoffe, sowie Metabolite und Umwandlungsprodukte auf landwirtschaftlich genutzte Flächen, aber auch Antibiotika-resistente (pathogene) Keime. Der Gemüseanbau ist für Wirtschaftsdünger ein wichtiger Anwendungsbereich. Vorhergehende Studien hatten ergeben, dass ein Transfer antibiotisch wirksamer Stoffe aus dem Boden in Nutzpflanzen und ihre Inkorporation in Pflanzenorgane möglich ist. Daher sind als Eintragsquelle für Antibiotika in die Nahrungsmittelkette auch kontaminierte Gemüse in Betracht zu ziehen, insbesondere solche, die als Rohkost verzehrt werden. Um Erkenntnisse über die mögliche Antibiotika-Kontamination verzehrstarker Gemüse, und damit Hinweise auf die Antibiotika-Exposition von Verbrauchern sowie die Verbreitung resistenter Bakterien durch Lebensmittel pflanzlicher Herkunft zu gewinnen, wurden die in dieser Arbeit beschriebenen Modellstudien durchgeführt.

Dazu wurden Weißkohl und Porree in den Vegetationsperioden 2011 und 2012 nach konventionellen landwirtschaftlichen Anbaumethoden auf Versuchsflächen (FH Südwestfalen, Abteilung Soest) angepflanzt und in einer praxisüblichen Aufwandmenge mit tierischen Exkrementen aus der Schweine- und Geflügelhaltung gedüngt. Die Exkremente waren vor der Ausbringung definiert mit Antibiotika (Tetracyclin, Enrofloxacin, Amoxicillin oder Ceftiofur: je 150 mg/kg Boden) und ESBL-produzierenden und Fluorchinolon-resistenten *Escherichia coli* ( $10^3$  KBE/mL) dotiert worden.

Zur Bestimmung der Antibiotikagehalte in Gemüsepflanzen und der Verteilung in den Pflanzenorganen wurden diese nach Beerntung analysiert. Dazu waren geeignete rückstandsanalytische Verfahren mit LC-MS/MS zu entwickeln. Ebenso wurden Antibiotikagehalte in Gülle und Boden bestimmt. Bakteriologische Analysen auf resistente Mikroorganismen wurden an der FU Berlin durchgeführt.

Die **Rückstandsanalysen** des im Oktober 2011 geernteten Porrees, der auf mit Enrofloxacin (ENR) dotierter Schweinegülle oder Hühnerkot gedüngten Parzellen angebaut worden war, ergaben in jungen Blättern minimale ENR-Rückstände bis zu 0,2 µg/kg FG (Frischgewicht). Ebenso ließen sich im Weißkohlkopf sehr geringe Spuren an ENR (0,3 µg/kg FG) nachweisen, sowohl nach der Düngung mit Schweinegülle als auch mit Hühnerkot. Bei Düngung mit Hühnerkot konnte ENR auch in den äußeren Blättern des Weißkohls nachgewiesen werden.

---

\* in Anlehnung an den RESET-Schlussbericht [154]

Die Düngung mit Tetracyclin (TC) dotierten Tierexkrementen (Schwein und Geflügel) führten beim Porree in jungen Blättern zu einer Belastung an TC von maximal 5,2 µg/kg FG. Der β-Lactam-Wirkstoff Amoxicillin (AMO) sowie seine Hauptmetaboliten Penicilloinsäure (AMA) und das Diketopiperazin (Diketo) von Amoxicillin waren in keiner Boden- und Gemüseprobe nachweisbar.

Die Ergebnisse der Analysen in der zweiten Anbauperiode von Weißkohl und Porree zeigten nach der Zwischenernte im Juli 2012 und in den Ernteproben vom September eine Belastung durch Enrofloxacin-Spuren, sowohl in Wurzeln (0,5 bis 2 µg/kg FG) als auch in essbaren Bestandteilen (Weißkohlkopf und junge Blätter des Porrees, unterhalb der Bestimmungsgrenze). Dieses Ergebnis ist mit den Befunden aus der vorhergehenden Anbauperiode vergleichbar und entspricht tendenziell den in Vorstudien unter Hydrokulturbedingungen durchgeführten Aufnahmeexperimenten, die eine auffällig hohe Pflanzenverfügbarkeit dieses Fluorchinolons erkennen ließen. AMO und Ceftiofur (CEF) waren, wie in den Ernteproben 2011, in keiner Gemüseprobe nachzuweisen.

Zur Aufklärung der Negativbefunde an β-Lactamen wurden ergänzende zeitabhängige Wiederfindungsstudien mit dotierten Gülle- und Bodenproben durchgeführt. Die Analysedaten ließen einen schnellen Verlust an AMO erkennen, u.a. verursacht durch die simultane Bildung der Penicilloinsäure. Neben dieser Umwandlungsreaktion dominierten adsorptive Vorgänge an die Bodenmatrix die Konzentrationsverläufe. Zwar war der Verlust von CEF in der Güllesuspension deutlich zu verfolgen, aber die Bestimmung möglicher Metabolite bzw. Abbauprodukte als Summenparameter führte zu keinem positiven Befund in Gülle und Boden.

Verdachtsbefunde auf mögliche Umwandlungs- und Abbauprodukte der β-Lactame ergaben sich jedoch durch eine detaillierte Auswertung der full-MS-Massenspektren von Pflanzen- und Gülleproben nach der „*spectral counting*“ Methode: In jungen und alten Blättern von Weißkohl und Porree sowie in AMO- und CEF-dotierter Schweinegülle und im Hühnerkot wurden charakteristische Signale möglicherweise von den Desaminierungsprodukten AMO/-NH<sub>3</sub> und AMA/-NH<sub>3</sub> erkannt. Ein weiterer Hinweis auf Phenolhydroxypyrazin lag in jungen Blattabschnitten des Porrees (Düngung Schweinegülle) vor. Zusätzlich konnten mögliche Spuren von AMO im Weißkohlkopf, CEF in Porreewurzeln und Desfuroylceftiofuracetamid (DCA) in Weißkohlblättern detektiert werden.

Die **Mikrobiologische Untersuchungen** ergaben, dass die in 2011 eingesetzten Tierexkremente (Schweinegülle und Hühnerkot) vor Versuchsbeginn frei von Fluorchinolon-resistenten und ESBL-bildenden *E. coli* waren. Im Boden ließen sich vor der Pflanzung *Pseudomonas*,

aber keine *E. coli* nachweisen. Allerdings zeigten die Setzlinge bereits vor der Pflanzung positive Befunde an ESBL-*E. coli* und auch Fluorchinolon-resistente *E. coli*. Die Untersuchungen zur Ernte im Oktober 2011 ergaben ESBL-*E. coli* Befunde im Boden (Parzelle Porree, Schweinegülle, ohne Antibiotika, mit ESBL) und  $\beta$ -Lactam-resistente *Pseudomonas* in den Pflanzen.

Im Unterschied zur Anbauperiode 2011 enthielt die originär antibiotikafreie Schweinegülle des Anbaujahres 2012 bereits ESBL-*E. coli*, die Gemüsesetzlinge und die Pflanzerde jedoch nicht. Nach der Beerntung wurden sowohl aus dem Boden der unterschiedlich mit Gülle beaufschlagten und Antibiotika-dotierten Versuchspartzen als auch aus Gemüsepflanzen zahlreiche  $\beta$ -Lactam resistente Mikroorganismen isoliert. Bemerkenswert ist der Befund in essbaren Teilen des Porrees. Offensichtlich überlebten in dem Feldversuch 2012 die zur Gülle dotierten ESBL-Bakterien im Boden die fünfmonatige Anbauperiode von der Düngung bis zur Ernte. Der organisch gedüngte Boden stellt somit ein Reservoir für multiresistente Keime dar, der zum Eintrag antibiotischer Resistenzen in die Umwelt und in die Nahrungsmittelkette beitragen kann.

Eine Folgerung aus den Ergebnissen der Rückstandsanalysen und der mikrobiologischen Untersuchungen ist, dass Konsumenten von konventionell angebautem Gemüse sowohl Kontaminationen von Antibiotikaspuren als auch resistenten Keimen ausgesetzt sein können.

Um die Auswirkungen von Fluorchinolonen, die in Gemüsepflanzen inkorporiert sind, auf Darmbakterien wie *E. coli* zu untersuchen, werden im Rahmen des Folgeprojektes RESET-II experimentelle Tierstudien am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt.

## 7 Literatur

---

1. Fleming A *Penicillin: Nobel Lecture, December 11, 1945*. [http://www.nobel-prize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.pdf](http://www.nobel-prize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.pdf), zuletzt geprüft am 31.01.2016
2. Küster A, Lehmann S, Hein A, Schönfeld J, UBA (Hrsg) *Antibiotika in der Umwelt – Wirkung mit Nebenwirkung*. UMID **2013**
3. Vockel A, Brand B, Rower K, Vogel A, Mehlich A, Stolz M, Grote M, Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes NRW (Hrsg) *Resistenzentwicklung und Rückstände in der landwirtschaftlichen Tierhaltung*. Abschlussbericht. Sonderprogramm Verbraucherschutz 2000-2002, Düsseldorf **2004**
4. Umweltbundesamt, Umweltbundesamt (Hrsg) *Arzneimittel in der Umwelt - Zu Risiken und Nebenwirkungen fragen Sie das Umweltbundesamt*. Texte 29/2005, Dessau-Roßlau **2005**
5. Ternes T, Löffler D, Meller M, Rombke J, Umweltbundesamt (Hrsg) *Behaviour of selected human and veterinary pharmaceuticals in aquatic compartments and soil*. Forschungsbericht 299 67 401/01. Texte 05/05 **2005**
6. Halling-Sørensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützhøft HC, Jørgensen SE *Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review*. Chemosphere **1998**; 36(2):357-393
7. Thiele-Bruhn S *Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review*. Z. Pflanzenernähr. Bodenk. **2003**; 166(2):145-167
8. Hamscher G, Sczesny S, Höper H, Nau H *Determination of Persistent Tetracycline Residues in Soil Fertilized with Liquid Manure by High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*. Anal Chem **2002**; 74(7):1509-1518
9. Hamscher G, Pawelzick HT, Hoper H, Nau H *Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure*. Environ Toxicol Chem **2005**; 24(4):861-868
10. Grote M, Schwake-Anduschus C, Stevens H, Michel R, Betsche T, Freitag M *Antibiotika-Aufnahme von Nutzpflanzen aus Gülle-gedüngten Böden - Ergebnisse eines Modellversuch*. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit **2006**; (1):38-50
11. Grote M, Kuhlmann B, Preuß G, Schulte-Ebbert U, Stevens H, Zullei-Seibert N *Tierarzneimittel in der Umwelt: Bewertung von Eintrag, Verlagerung und Resistenzentwicklung unter Gesichtspunkten des Verbraucherschutzes*. Veröffentlichungen des Instituts für Wasserforschung GmbH Dortmund in Kooperation mit der Fakultät für Naturwissenschaften, Department Chemie der Universität Paderborn, der Dortmunder Energie- und Wasserversorgung GmbH, der Westfälischen Wasser- und Umweltanalytik GmbH und der Wasserwerke Westfalen GmbH **2007**; (66):191
12. Grote M, Schwake-Anduschus C, Michel R, Stevens H, Heyser W, Langenkämper G, Betsche T, Freitag M *Incorporation of veterinary antibiotics into crops from manured soil*. Landbauforschung Völkenrode. - FAL. Agricultural Research **2007**; (57 (1)):25-32
13. Grote M *Kapitel 8: Veterinärantibiotika, 8.1: Anwendung von Antibiotika in der Veterinär- und Humanmedizin und die Folgen*. in: Rückstände und Kontaminanten in Getreide und Getreideerzeugnissen. Herbert Otteneeder Verlag: AgriMedia **2010**
14. Vockel A, Wagener H-A, Klemm W, Röwer K, Mehlich A, Grote M *Bestimmung von Tetracyclinrückständen mittels LC-MS/MS in lebensmittelliefernden Schweinen*. Lebensmittelchemie **2001**; 55(55):67-68

15. Grote M, Vockel A, Schwarze D, Mehlich A, Freitag M *Investigation on the fate of antibiotics used in Pig farming in food chain and environment*. (Part 1). Fresenius Environmental Bulletin - FEB **2004**; (13 (11b)):1216-1224
16. Freitag M, Yolcu D, Hayen H, Betsche T, Grote M *Screening zum Antibiotika-Transfer aus dem Boden in Getreide in Regionen Nordrhein-Westfalens mit großen Viehbeständen*. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit **2008**; (3):174-184
17. Yolcu D, Grote M, Hayen H, Freitag M *Antibiotika-Rückstände in Getreide aus viehstarken Gebieten – Methodenentwicklung und Ergebnisse einer Screening-Studie*. Lebensmittelchemie **2009**; (3):70
18. Krasilnikov NA *Soil, microorganisms and higher plants. Part IV. Interaction between soil microorganisms and plants*. Übersetzung (1961) The national science foundation, Washington .D.C. Academy of Sciences of the USSR, Moskau **1958**
19. Grote M, Meriç D, Langenkämper G, Hayen H, Betsche T, Freitag M *Untersuchungen zum Transfer pharmakologisch wirksamer Substanzen aus der Nutztierhaltung in Porree und Weißkohl*. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit **2009**; (4):287-304
20. Grote M und Meriç D *Antibiotikatransfer aus dem Boden in Nutzpflanzen*. Mitt Umweltchem Ökotox **2010**; (16/1):9-12
21. Chowdhury F, Langenkämper G, Grote M *Studies on uptake and distribution of antibiotics in red cabbage*. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit **2016**; 11(1):61-69, online veröffentlicht am 11. Dezember 2015
22. Bundestag *Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch - LFGB) § 10 Stoffe mit pharmakologischer Wirkung* Fassung vom 03.06.2013
23. Bundesinstitut für Risikobewertung, Bundesinstitut für Risikobewertung (Hrsg) *Nulltoleranzen in Lebens- und Futtermitteln: Positionspapier des BfR vom 12. März 2007*
24. Riesenfeld CS, Goodman RM, Handelsman J *Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes*. Environ Microbiol **2004**; 6(9):981-989
25. D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD *Sampling the antibiotic resistome*. Science **2006**; 311(5759):374-377
26. Yim G, Huimi Wang H, Davies J *The truth about antibiotics*. Quorum sensing in human pathogens **2006**; 296(2-3):163-170
27. Goh E-B, Yim G, Tsui W, McClure J, Surette MG, Davies J *Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **2002**; 99(26):17025-17030
28. Heuer H und Smalla K *Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months*. Environ Microbiol **2007**; 9(3):657-666
29. Kemper N *Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment*. Ecological Indicators **2008**; 8(1):1-13
30. Dettenkofer M, Ackermann M, Eikenberg M, Merkel H *Auswirkungen des Einsatzes von Antibiotika und Substanzen mit antibiotischer Wirkung in der Landwirtschaft und im Lebensmittelsektor*. Ernährungswende-Materialienband **2004**
31. Bundesinstitut für Risikobewertung *Rückstände von Tierarzneimitteln in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft*. Information Nr. 019/2010 des BfR vom 15. Februar 2010 **2010**
32. Kreienbrock L (Hrsg) *ESBL und Fluorchinolon-Resistenz in Enterobacteriaceae, RESET: Schlussbericht an das Deutsche Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V., DLR Laufzeit: 2010-2013*
33. Brunton LL (Hrsg) *Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. Mc Graw Hill, New York **2011**

34. Fernández L, Breidenstein, Elena B M, Hancock, Robert E W *Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics*. Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy **2011**; 14(1):1-21
35. Ullrich E, Michels I, Rohde S, Müller I, Hanschmann G, Pößneck J, Reuschel C, Talhofer F, Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie (Hrsg) *Antibiotika aus der Nutztierhaltung in der Umwelt*. Schriftenreihe in Vorbereitung **2016**
36. Roth *Antibiotika*. technische Info. Antibiotika 2009, zuletzt geprüft am 30.03.2015
37. Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie VETIDATA: *Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittelanwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht*. Internetplattform. <http://www.vetidata.de/>, zuletzt geprüft am 08.02.2016
38. Steitz TA *Von der Struktur und Funktion des Ribosoms zu neuen Antibiotika (Nobel-Aufsatz)*. Angewandte Chemie **2010**; 122(26):4482-4500
39. Fauler *Wirkmechanismen von Antibiotika und bakterielle Resistenz*. Präz. Gesundheitsf. **2014**; 9:159-165
40. DocCheck Flexikon *Das Medizinlexikon zum Medmachen*. <http://flexikon.doc-check.com>, zuletzt geprüft am 30.03.2015
41. Gualerzi CO, Brandi L, Fabbretti A, Pon CL *Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance*. Wiley-VCH, Weinheim **2013**
42. Wiesner E und Ribbeck R *Lexikon der Veterinärmedizin*. Enke Verlag **2000**
43. Bornscheuer U, Streit W (Hrsg) *Römp. Thieme*, Stuttgart **2014**
44. Öller R *Antibiotika*. [http://www.scientific.at/2001/roe\\_0105.htm](http://www.scientific.at/2001/roe_0105.htm), zuletzt geprüft am 08.02.2016
45. Vitz J *Synthesen aus der Reihe der 4H-Anthra[1,2-b]pyran-Antibiotika, Totalsynthese von Premithramycinon H*. Dissertation, Paderborn **2004**
46. Stiftung Warentest *Die wichtigsten Arzneimittel*. test Spezial Medikamente. <https://www.test.de/presse/pressemitteilungen/test-Spezial-Medikamente-Die-wichtigen-Arzneimittel-1099616-0/> 30.04.2003, zuletzt geprüft am 24.01.2016
47. St.-Antonius-Hospital *Antibiotika: Ein Meilenstein*. Interview mit Chefapotheker Jörg Gildehaus. SAH-Journal; (3-2011)
48. Lausch E *Wie Alex Fleming das Penicillin entdeckte - Am Anfang war die Panne*. Die Zeit; (14/1996)
49. vfa *Neue Antibiotika: Den Vorsprung gegenüber resistenten Bakterien wahren*. Bild. <http://www.vfa.de/de/arzneimittel-forschung/woran-wir-forschen/neue-antibiotika-den-vorsprung-wahren.html> 2014, zuletzt geprüft am 30.03.2015
50. EU-Kommission *Aktionsplan zur Abwehr der steigenden Gefahr der Antibiotikaresistenz*. Mitteilung KOM(2011) 748 endgültig, Brüssel **2011**
51. Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR *Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production*. International journal of antimicrobial agents **2001**; 17(6):431-437
52. Kim HB, Borewicz K, White BA, Singer RS, Sreevatsan S, Tu ZJ, Isaacson RE *Microbial shifts in the swine distal gut in response to the treatment with antimicrobial growth promoter, tylosin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **2012**; 109(38):15485-15490
53. *Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung: (EC) No 1831/2003*. In: Amtsblatt der Europäischen Union, 2003b
54. McManus PS, Stockwell VO, Sundin GW, Jones AL *antibiotic use in plant agriculture*. Annu. Rev. Phytopathol. **2002**; 40(1):443-465
55. *Entscheidung der Kommission vom 30. Januar 2004 über die Nichtaufnahme bestimmter Wirkstoffe in Anhang I der Richtlinie 91/414/EWG des Rates sowie den Widerruf der Zulassungen für Pflanzenschutzmittel mit diesen Wirkstoffen: 2004/129/EGEntsch:2004-01-30*. In: Amtsblatt der Europäischen Union. Nr. L 037 vom 10.02.2004

56. BMELV Referat 512, Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (Hrsg) *Bericht über die Feuerbrandsituation im Jahr 2012: Strategie zur Bekämpfung des Feuerbranderregers ohne Antibiotika* **2013**
57. *Amtsblatt der Europäischen Union*. Nr. L 037 vom 10.02.2004
58. Kümmerer K, Alexy R, Kümpe T, Schöll A, Kalsch W, Junker, Umweltbundesamt (Hrsg) *Eintrag von Antibiotika in die aquatische Umwelt: Prüfung der biologischen Abbaubarkeit ausgewählter Antibiotika, ihr Vorkommen im Abwasser und ihr möglicher Einfluss auf die Reinigungsleistung kommunaler Kläranlagen; Identifizierung von Risikofeldern*. Abschlussbericht ; F&E-Vorhaben 298 63 722. Band 00, Freiburg **2003**
59. Bergmann A, Fohrmann R, Weber F-A, Umweltbundesamt (Hrsg) *Zusammenstellung von Monitoringdaten zu Umweltkonzentrationen von Arzneimitteln*. Texte 66, Dessau-Roßlau **2011**
60. Nguyen ST, Ding X, Butler MM, Tashjian TF, Peet NP, Bowlin TL *Preparation and anti-bacterial evaluation of decarboxylated fluoroquinolones*. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**; 21(19):5961-5963
61. Hooper DC *Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones*. *Clin Infect Dis* **2000**; 31 Suppl 2:S24-8
62. Sturini M, Speltini A, Maraschi F, Profumo A, Pretali L, Fasani E, Albini A *Sunlight-induced degradation of soil-adsorbed veterinary antimicrobials Marbofloxacin and Enrofloxacin*. *Chemosphere* **2012**; 86(2):130-137
63. van Doorslaer X, Dewulf J, van Langenhove H, Demeestere K *Fluoroquinolone antibiotics: an emerging class of environmental micropollutants*. *The Science of the total environment* **2014**; 500-501:250-269
64. Chopra I und Roberts M *Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance*. *Microbiol Mol Biol Rev* **2001**; 65(2):232-260
65. Draper MP, Weir S, Maccone A, Donatelli J, Trieber CA, Tanaka SK, Levy SB *Mechanism of action of the novel aminomethylcycline antibiotic omadacycline*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2014**; 58(3):1279-1283
66. Warman PR und Thomas RL *Chlortetracycline in soil amended with poultry manure*. *Can. J. Soil Sci.* **1981**; 61:161-163
67. Kahlmeter G *The 2014 Garrod Lecture: EUCAST - are we heading towards international agreement?* *J Antimicrob Chemother* **2015**; 70(9):2427-2439
68. European Centre for Disease Prevention and Control *EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013*. *EFSA Journal* **2015**; 13(2):4036
69. Wright G und Poiner H *Antibiotic resistance is ancient: implications for drug discovery*. *Trends in Microbiology* **2012**
70. Dantas G und Sommer MOA *Die vielen Wege zur Antibiotikaresistenz*. *Spektrum der Wissenschaft* **2015**; (März):36-45
71. Spektrum Verlag. [www.spektrum.de/lexikon/biologie](http://www.spektrum.de/lexikon/biologie), zuletzt geprüft am 09.06.2015
72. Pfeifer Y, Witte W, Werner G *ESBL-bildende Enterobacteriaceae bei Mensch und Tier*. [http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Antibiotikaresistenz/LA\\_MRSA\\_und\\_ESBL.html#Start](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Antibiotikaresistenz/LA_MRSA_und_ESBL.html#Start), zuletzt geprüft am 09.06.2015
73. Witte W und Mielke M  *$\beta$ -Laktamasen mit breitem Wirkungsspektrum*. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* **2003**; 46(10):881-890
74. Suresh JA *The Changing Epidemiology of Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) Infections of the Urinary Tract Focusing on Clinical Resistance and Therapeutic Options*, Texas **2011**
75. Pfeifer Y und Eller C *Aktuelle Daten und Trends zur Beta-Lactam-Resistenz bei gram-negativen Infektionserregern*. *Bundesgesundheitsblatt* **2012**; 55:1405-1409

76. Salviati C von, Laube H, Guerra B, Roesler U, Frieze A *Emission of ESBL/AmpC-producing Escherichia coli from pig fattening farms to surrounding areas*. Veterinary microbiology **2015**; 175(1):77-84
77. Laube H, Frieze A, Salviati C von, Guerra B, Rosler U *Transmission of ESBL/AmpC-producing Escherichia coli from broiler chicken farms to surrounding areas*. Veterinary microbiology **2014**; 172(3-4):519-527
78. Laube H, Frieze A, Salviati C, Guerra B, Kasbohrer A, Kreienbrock L, Roesler U *Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/AmpC-producing Escherichia coli at German broiler chicken fattening farms*. Appl Environ Microbiol **2013**; 79(16):4815-4820
79. Hille K, Fischer J, Falgenhauer L, Sharp H, Brenner GM, Kadlec K, Frieze A, Schwarz S, Imirzalioglu C, Kietzmann M, Munchhausen C von, Kreienbrock L *On the occurrence of extended-spectrum- and AmpC-beta-lactamase-producing Escherichia coli in livestock: results of selected European studies*. Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift **2014**; 127(9-10):403-411
80. Robert Koch Institut *Bedeutung von LA-MRSA und ESBL-bildenden Enterobacteriaceae bei Masttieren für den Menschen*. [http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Antibiotikaresistenz/LA\\_MRSA\\_und\\_ESBL.html](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Antibiotikaresistenz/LA_MRSA_und_ESBL.html), zuletzt geprüft am 24.01.2016
81. Nilsson O, Borjesson S, Landen A, Bengtsson B *Vertical transmission of Escherichia coli carrying plasmid-mediated AmpC (pAmpC) through the broiler production pyramid*. The Journal of antimicrobial chemotherapy **2014**; 69(6):1497-1500
82. Pfeifer Y *ESBL and (fluoro)quinolone resistance in Enterobacteriaceae: Das RESET-Projekt*. [http://www.lgl.bayern.de/aus\\_fort\\_weiterbildung/veranstaltungen/kongresse\\_veranstaltungen/doc/lare\\_symp\\_3\\_2\\_pfeifer\\_a.pdf](http://www.lgl.bayern.de/aus_fort_weiterbildung/veranstaltungen/kongresse_veranstaltungen/doc/lare_symp_3_2_pfeifer_a.pdf), zuletzt geprüft am 03.02.2016
83. Meyer E *Antibiotikaeinsatz und Resistenzentwicklung in Deutschland: Studie im Auftrag der Bundestagsfraktion Bündnis 90/Die Grünen*
84. Königer D, Gastmeier P, Kola A, Schwab F, Meyer E *Vegetarians are not less colonized with extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing bacteria than meat eaters*. Antimicrob Chemother. **2014**; (69):281-282
85. Reuland EA, Al Naiemi N, Raadsen SA, Savelkoul, P H M, Kluytmans, J A J W, Vandenbroucke-Grauls, C M J E *Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in raw vegetables*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **2014**; 33(10):1843-1846
86. Loncaric I, Stalder GL, Mehinagic K, Rosengarten R, Hoelzl F, Knauer F, Walzer C *Comparison of ESBL--and AmpC producing Enterobacteriaceae and methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from migratory and resident population of rooks (Corvus frugilegus) in Austria*. PLoS One **2013**; 8(12):e84048
87. von Wintersdorff CJH, Penders J, Stobberingh EE, Oude Lashof AML, Hoebe CJPA, Savelkoul PHM, Wolffs PFG *High rates of antimicrobial drug resistance gene acquisition after international travel, The Netherlands*. Emerg Infect Dis **2014**; 20(4):649-657
88. Hacker J und Heesemann J *Molekulare Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, Heidelberg **2000**
89. Knapp CW, Dolfin J, Ehlert, Phillip A I, Graham DW *Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940*. Environ. Sci. Technol. **2010**; 44(2):580-587
90. Castro AP, Fernandes, Gabriel Da Rocha, Franco OL *Insights into novel antimicrobial compounds and antibiotic resistance genes from soil metagenomes*. Frontiers in Microbiology **2014**; 5
91. Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer, Morten O A, Dantas G *The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens*. Science **2012**; 337(6098):1107-1111



92. Wang F-H, Qiao M, Su J-Q, Chen Z, Zhou X, Zhu Y-G *High throughput profiling of antibiotic resistance genes in urban park soils with reclaimed water irrigation*. Environ. Sci. Technol. **2014**; 48(16):9079-9085
93. Pietramellara G, Ceccherini MT, Ascher J, Nannipieri P *Persistence of transgenic and not transgenic extracellular DNA in soil and bacterial transformation*. Riv Biol **2006**; 99(1):37-68
94. Popowska M, Rzeczycka M, Miernik A, Krawczyk-Balska A, Walsh F, Duffy B *Influence of soil use on prevalence of tetracycline, streptomycin, and erythromycin resistance and associated resistance genes*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **2012**; 56(3):1434-1443
95. Sengelov G, Agerso Y, Halling-Sorensen B, Baloda SB, Andersen JS, Jensen LB *Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry*. Environment International **2003**; 28(7):587-595
96. Andrews, Robert E Jr, Johnson WS, Guard AR, Marvin JD *Survival of enterococci and Tn916-like conjugative transposons in soil*. Can J Microbiol **2004**; 50(11):957-966
97. Aminov RI, Chee-Sanford JC, Garrigues N, Teferedegne B, Krapac IJ, White BA, Mackie RI *Development, validation, and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of gram-negative bacteria*. Appl Environ Microbiol **2002**; 68(4):1786-1793
98. Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI *Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins*. Appl Environ Microbiol **2001**; 67(1):22-32
99. Chee-Sanford JC, Aminov RI, Krapac IJ, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI *Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities*. Appl Environ Microbiol **2001**; 67(4):1494-1502
100. Bundesministerium für Gesundheit, das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, Bundesministerium für Bildung und Forschung *DART Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie: Zwischenbericht*, Berlin **2011**
101. Wildner M und Wirtz A „One Health“ – Risikomanagement im Öffentlichem Raum. Diskussionsforum „Forschung trifft Praxis: Transfer und Herausforderungen der Zoonosenforschung“, Berlin **2014**
102. Global Risk Forum GRF Davos *One Health - integratives Management von gesundheitlichen Risiken*. <http://onehealth.grforum.org/de/one-health/one-health-kurz-erklart/>, zuletzt geprüft am 24.01.2016
103. Bundesministerium für Gesundheit, das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, Bundesministerium für Bildung und Forschung, Bundesministerium für Gesundheit, Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, Bundesministerium für Bildung und Forschung (Hrsg) *DART 2020: Antibiotika-Resistenzen bekämpfen zum Wohl von Mensch und Tier*. Beschluss des Bundeskabinetts **2015**
104. große Beilage T, Emmerich I, Krämer U *Arzneimittelrecht für Nutztierhalter*. aid **2014**
105. Honscha W, van Rennings L, von Münchhausen C, Kreienbrock L, Käsbohrer A, Otilie H *Systeme zur Erfassung von Antibiotikaabgabe und -einsatz in Deutschland - ein Überblick*. Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung **2014**; (5):148-151
106. Wallmann J, Bender A, Hauck R, Reimer I, Heberer T *Abgabemengenerfassung antimikrobiell wirksamer Stoffe in Deutschland 2013: Auswertung der nach DIMDI-AMV eingereichten Daten 2013 und Vergleich mit den Vorjahren*. Deutsches Tierärzteblatt **2014**; (9):1234-1239
107. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit *Antibiotikaabgabe in der Tiermedizin sinkt weiter*. BVL - Presse- und Hintergrundinformationen -. [http://www.bvl.bund.de/DE/08\\_PresseInfothek/01\\_FuerJournalisten/01\\_Presse\\_un](http://www.bvl.bund.de/DE/08_PresseInfothek/01_FuerJournalisten/01_Presse_un)

- d\_Hintergrundinformationen/05\_Tierarzneimittel/2015/2015\_07\_28\_pi\_Antibiotikaabgabemenge2014.html 2015, zuletzt geprüft am 13.10.2015
108. Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft, Verbraucherschutz und Landesentwicklung, Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft, Verbraucherschutz und Landesentwicklung (Hrsg) *Bericht über den Antibiotikaeinsatz in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung in Niedersachsen 2011*
  109. Landeamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen Abteilung 8 Verbraucherschutz, Tiergesundheit, Agrarmarkt, Landeamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen Abteilung 8 Verbraucherschutz, Tiergesundheit, Agrarmarkt (Hrsg) *Evaluierung des Antibiotikaeinsatzes in der Hähnchenhaltung: Abschlussbericht*, Recklinghausen **2011**
  110. Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen, Minister Johannes Remmel *Antibiotikaeinsatz in der Hähnchenmast*. Brief, Düsseldorf **2011**
  111. Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung *VetCab-Studie*. <http://vetcab.de/>, zuletzt geprüft am 24.01.2016
  112. Merle R, Hajek P, Käsbohrer A, Hegger-Gravenhorst C, Mollenhauer Y, Robanus M, Ungemach F-R, Kreienbrock L *Monitoring of antibiotic consumption in livestock: A German feasibility study*. Preventive Veterinary Medicine **2012**; 104(1–2):34–43
  113. van Rennings L, Munchhausen C von, Hartmann M, Ottilie H, Honscha W, Kasbohrer A, Kreienbrock L *Antibiotic usage and antibiotic sales in Germany in 2011--the situation of drug usage in veterinary medicine*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr **2014**; 127(9–10):366–374
  114. Buettner-Peter U *Bekanntmachung des Berechnungsverfahrens zu Ermittlung der Therapiehäufigkeit eines Tierhaltungsbetriebes durch die zuständige Behörde*. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz **2013**
  115. Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung *VetCab-Sentinel*. <https://ibi.tiho-hannover.de/vetcab/pages/4>, zuletzt geprüft am 04.06.2015
  116. QS *Übersicht: Kennzahlen I und II im QS-Antibiotikamonitoring und in der staatlichen Datenbank*. [https://www.q-s.de/services/files/monitoringprogramme/150417\\_RS\\_Antibiotikamonitoring\\_Kennzahlen.pdf](https://www.q-s.de/services/files/monitoringprogramme/150417_RS_Antibiotikamonitoring_Kennzahlen.pdf) 2015, zuletzt geprüft am 10.07.2015
  117. QS *Gemeinsam mit starken Partnern*. <https://www.q-s.de/unternehmen/organisation-qs.html>, zuletzt geprüft am 12.07.2015
  118. QS *Antibiotikaeinsatz richtig einordnen mit dem QS-Therapieindex 2015*
  119. QS *QS-Jahresbericht 2012*. [https://www.q-s.de/services/files/mediencenter/publikationen/QS-Jahresbericht-ES\\_2013.pdf](https://www.q-s.de/services/files/mediencenter/publikationen/QS-Jahresbericht-ES_2013.pdf), zuletzt geprüft am 10.07.2015
  120. QS *Betriebsergebnis Benchmark*. <http://www.qualitytype.de/sites/default/files/pictures/Benchmark.JPG> 2015, zuletzt geprüft am 10.07.2015
  121. Merle R *QS Antibiotikamonitoring bei Geflügel und Mastschweinen*. BfR-Symposium, Berlin **2013**
  122. Landwirtschaftliches Wochenblatt Westfalen-Lippe *Weniger Antibiotika als Ziel: Grünes Licht für die Antibiotika-Minimierungsstrategie in der Tierhaltung / Kompromiss zur Novelle des Arzneimittelgesetzes / Schärfere Sanktionen für Tierhalter / Bauernverband erwartet mehr Bürokratie 2013; (27):15*
  123. MIV Milchindustrie-Verband e.V. *Antibiotikaeinsatz in der Tierhaltung –: ein Faktencheck*. <http://www.milchindustrie.de/aktuelles/aktuelle-infos/antibiotikaeinsatz-in-der-tierhaltung-ein-faktencheck/> 2015, zuletzt geprüft am 10.07.2015
  124. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V., Infektiologie Freiburg, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V., Infektiologie Freiburg (Hrsg) *GERMAP 2012: Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch*.

- Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen, Rheinbach **2014**
125. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit *Resistenzsituation bei klinisch wichtigen tierpathogenen Bakterien 2011/2012: Berichte zur Resistenzmonitoringstudie*. BVL-Report 9.5, Berlin **2015**
  126. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit *Nationales Resistenzmonitoring: Kampf gegen resistente Keime*.  
[http://www.bvl.bund.de/DE/09\\_Untersuchungen/01\\_Aufgaben/03\\_Nationales%20Resistenz-Monitoring/untersuchungen\\_NatResistenzmonitoring\\_node.html](http://www.bvl.bund.de/DE/09_Untersuchungen/01_Aufgaben/03_Nationales%20Resistenz-Monitoring/untersuchungen_NatResistenzmonitoring_node.html), zuletzt geprüft am 12.07.2015
  127. Kasper H *12 Jahre Resistenzmonitoring bei tierpathogenen Bakterien in Deutschland: ausgewählte Ergebnisse*. Symposium 2013, Berlin **2013**
  128. Schroeter A, Tenhagen B-A, Heckenbach K, Guerra B, Helmuth R, Beutlich J, Hensel A, Appel B, Käsbohrer A, Schroeter A, Käsbohrer A (Hrsg) *Deutsche Antibiotika-Resistenzsituation in der Lebensmittelkette - DARLink: Salmonella 2000–2008*, Berlin **2010**
  129. Schroeter A, Tenhagen B-A, Alt K, Fetch A, Stingl K, Heckenbach K, Guerra B, Helmuth R, Beutlich J, Hensel A, Appel B, Käsbohrer A, Schroeter A, Käsbohrer A (Hrsg) *Deutsche Antibiotika-Resistenzsituation in der Lebensmittelkette - DARLink: 2009*, Berlin **2012**
  130. Bundesinstitut für Risikobewertung *Antibiotikaresistenzen in der Lebensmittelkette: BfR veröffentlicht zwei Berichte zur Resistenz-Situation bei verschiedenen Bakteriengruppen*. [http://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2010/18/antibiotikaresistenzen\\_in\\_der\\_lebensmittelkette-53288.html](http://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2010/18/antibiotikaresistenzen_in_der_lebensmittelkette-53288.html) 2010
  131. European Medicines Agency und European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, European Medicines Agency, EMA/333921/2014 (Hrsg) *Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2012: Fourth ESVAC report* **2014**
  132. European Centre for Disease Prevention and Control , European Food Safety Authority , European Medicines Agency *ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals* **2013**
  133. European Food Safety Authority, European Food Safety Authority (Hrsg) *Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection including a proposal for a harmonized monitoring scheme of antimicrobial resistance in Salmonella in fowl (Gallus gallus), turkeys and pigs and Campylobacter jejuni and C. coli in broilers*, Parma, Italien **2007**
  134. EU-Kommission *Progress report on the Action plan against the rising threats from Antimicrobial Resistance*. commission staff working document. SWD(2015) 59 final, Brüssel **2015**
  135. EU *Vorschlag für eine Verordnung des europäischen Parlaments und des Rates über Tierarzneimittel* Fassung vom COM(2014) 558 final 2014/0257 (COD)
  136. Basaraba RJ, Oehme FW, Vorhies MW, Stokka GL *Toxicosis in cattle from concurrent feeding of monensin and dried distiller's grains contaminated with macrolide antibiotics*. J Vet Diagn Invest **1999**; 11(1):79-86
  137. Islam M, Toledo R, Hamdy M *Stability of virginiamycin and penicillin during alcohol fermentation*. Biomass and Bioenergy **1999**; 17(5):369-376
  138. Jacob ME, Fox JT, Narayanan SK, Drouillard JS, Renter DG, Nagaraja TG *Effects of feeding wet corn distillers grains with solubles with or without monensin and tylosin on the prevalence and antimicrobial susceptibilities of fecal foodborne pathogenic and commensal bacteria in feedlot cattle*. J Anim Sci **2008**; 86(5):1182-1190
  139. Hannappel S, Groenweg J, Zühlke S, Umweltbundesamt (Hrsg) *Antibiotika und Antiparasitika im Grundwasser unter Standorten mit hoher Viehbesatzdichte*. Texte 27, Dessau-Roßlau **2014**

140. Engelmann U, Sächsisches Landesamt für Umwelt und Geologie (Hrsg) *Arzneistoffbericht 2007: Arzneimittelwirkstoffe, Antibiotika und Röntgenkontrastmittel in Abwässereinleitungen und Oberflächengewässern in Sachsen*. Das Lebensministerium, Bautzen **2007**
141. Kay P, Blackwell PA, Boxall ABA *Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land*. Chemosphere **2005**; 59(7):951-959
142. Czekalski N, Sigdel R, Birtel J, Matthews B, Bürgmann H *Does human activity impact the natural antibiotic resistance background? Abundance of antibiotic resistance genes in 21 Swiss lakes*. Environment International **2015**; 81(0):45-55
143. Clara M, Gans O, Humer F, Weiß S, Zieritz I, Umweltbundesamt GmbH (Hrsg) *Antibiotika im Grundwasser: Sondermessprogramm im Rahmen der Gewässerzustandsüberwachungsverordnung*, Wien **2010**
144. Rohweder U, Freie und Hansestadt Hamburg Behörde für Hygiene und Umwelt im Auftrag des Bund/Länderausschusses für Chemikaliensicherheit (Hrsg) *Arzneimittel in der Umwelt: Auswertung der Untersuchungsergebnisse*, Hamburg **2003**
145. Keen P und Patrick D *Tracking Change: A Look at the Ecological Footprint of Antibiotics and Antimicrobial Resistance*. Antibiotics **2013**; 2(2):191-205
146. Gothwal R und Shashidhar T *Antibiotic Pollution in the Environment: A Review*. Clean Soil Air Water **2015**; 43(4):479-489
147. Ebert I, Amato R, Hein A, Konradi S, Umweltbundesamt (Hrsg) *Arzneimittel in der Umwelt - vermeiden, reduzieren, überwachen*. Hintergrund, Fachgebiet IV 2.2 Arzneimittel, Wasch- und Reinigungsmittel **2014**
148. Beek Tad, Weber F-A, Bergmann A *Results of a Global Database of Measured Environmental Concentrations (MEC)*. Global Occurrence of Pharmaceuticals in the Environment: Pharmaceuticals in the Environment: Global occurrence, effects, and options for action, Genf **2014**
149. Grudinski A *Umweltrelevanz von Antibiotika in der Landwirtschaft*. Bachelorarbeit, Kiel **2006**
150. Regierung von Unterfranken. <http://www.aktiongrundwasserschutz.de/trinkwasser-fuer-unterfranken/einfluesse/landwirtschaft/>, zuletzt geprüft am 02.05.2015
151. Kim K-R, Owens G, Kwon S-I, So K-H, Lee D-B, Ok Y *Occurrence and Environmental Fate of Veterinary Antibiotics in the Terrestrial Environment*. Water Air Soil Pollut **2011**; 214(1-4):163-174
152. Halling-Sørensen B, Jensen J, Tjørnelund J, Montforts, M. H. M. M. *Worst-Case Estimations of Predicted Environmental Soil Concentrations (PEC) of Selected Veterinary Antibiotics and Residues Used in Danish Agriculture*. In: Kümmerer K (Hrsg): *Pharmaceuticals in the Environment*. Springer Berlin Heidelberg **2001**, 143-157
153. Kroker R *Aspekte zur Ausscheidung antimikrobiell wirksamer Substanzen nach der chemotherapeutischen Behandlung von Nutztieren*. Wissenschaft und Umwelt **1983**; (4):305-308
154. Grafe A *Untersuchungen zum Einsatz pharmakologisch wirksamer Stoffe in der Veredelungswirtschaft unter besonderer Berücksichtigung der Tetrazykline*. Cuvillier, Göttingen **2001**
155. Boxall ABA, Fogg LA, Blackwell PA, Kay P, Pemberton EJ, Croxford A *Veterinary medicines in the environment*. Rev Environ Contam Toxicol **2004**; 180:1-91
156. Thiele-Bruhn S und Peters D *Photodegradation of pharmaceutical antibiotics on slurry and soil surfaces*. Landbauforschung Völknerode **2007**; 57(1):13-23
157. Ratsak C, Guhl B, Zuhlke S, Delschen T *Veterinärantibiotikarückstände in Gülle und Gärresten aus Nordrhein-Westfalen*. Environmental Sciences Europe **2013**; 25(1):7
158. Bayrische Landesanstalt für Landwirtschaft, Bayrische Landesanstalt für Landwirtschaft (Hrsg) *Schweinegülle ? Quelle für potentiell unerwünschte Stoffe?* Schriftenreihe, Freising-Weihenstephan **2006**

159. Winckler C, Engels H, Hund-Rinke K, Luckow T, Simon M, Steffens G, UBA (Hrsg) *Verhalten von Tetrazyklinen und anderen Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden: Wirkung von Tetrazyklinen und anderen Tierarzneimitteln auf die Bodenfunktion* **2004**
160. Motoyama M, Nakagawa S, Tanoue R, Sato Y, Nomiyama K, Shinohara R *Residues of pharmaceutical products in recycled organic manure produced from sewage sludge and solid waste from livestock and relationship to their fermentation level*. Chemosphere **2011**; 84(4):432-438
161. Karıcı A und Balcıoğlu IA *Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey*. Science of The Total Environment **2009**; 407(16):4652-4664
162. Schwarz L, Umweltbundesamt (Hrsg) *Transformation von Tierarzneimitteln und Bioziden in Gülle: -Eine Literaturstudie-*
163. Bayerisches Landesamt für Umwelt *Austrag von Tierarzneimitteln aus Wirtschaftsdünger in Sickerwasser, Grundwasser und oberirdische Gewässer*. Abschlussbericht **2008**
164. Sattelberger R, Gans O, Martínez E *Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden*. Umweltbundesamt, Wien **2005**
165. Martinez-Caballo E, Gonzalez-Barreiro C, Scharf S, Gans O *Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria*. Environ Pollut **2007**; 148:570-579
166. Zhang Y, Zhang C, Parker DB, Snow DD, Zhou Z, Li X *Occurrence of antimicrobials and antimicrobial resistance genes in beef cattle storage ponds and swine treatment lagoons*. Science of The Total Environment **2013**; 463-464(0):631-638
167. Joy SR, Bartelt-Hunt SL, Snow DD, Gilley JE, Woodbury BL, Parker DB, Marx DB, Li X *Fate and Transport of Antimicrobials and Antimicrobial Resistance Genes in Soil and Runoff Following Land Application of Swine Manure Slurry*. Environ. Sci. Technol. **2013**; 47(21):12081-12088
168. Schlüsener M, Bester K, Spiteller M *Determination of antibiotics such as macrolides, ionophores and tiamulin in liquid manure by HPLC-MS/MS*. Anal Bioanal Chem **2003**; 375(7):942-947
169. Höper H, Kues J, Nau H, Hamscher G *Eintrag und Verbleib von Tierarzneimittelwirkstoffen in Böden*. Bodenschutz **2002**; (4):141-148
170. Harms K, Bauer J *Detection and Occurrence of Antibiotics and their Metabolites in Pig Manure in Bavaria (Germany)*. In: Antimicrobial Resistance in the Environment. John Wiley & Sons, Inc **2011**, 291-307
171. Mohring SAI, Tuerk J, Hamscher G *Fate of sulfonamides during anaerobic digestion of manure*. Oral communications environmental toxicology. J Vet Pharmacol Ther **2009**; 32 (Suppl. 1):59-127
172. Kues J, Höper H, Pawelzick HT, Pluquet E, Hamscher G, In: Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen, Referat IV.6 Bodenschutz und Bundesverband Boden (Hrsg). (Hrsg) *Einträge potenzieller Schadstoffe in den Boden über Wirtschaftsdünger. Wirkung auf Bodenorganismen und Verlagerung*. Bodenschutz – europäisch und lokal. Publikation zur gemeinsamen Fachtagung – soil protection: publication by the Joint Specialist Conference (Umwelt), Berlin **2004**
173. Haller YM, Muller SR, McArdell CS, Alder AC, Suter M-F *Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and Trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr A **2002**; 952:111-120
174. McKinney CW, Loftin KA, Meyer MT, Davis JG, Pruden A *tet and sul antibiotic resistance genes in livestock lagoons of various operation type, configuration, and antibiotic occurrence*. Environ. Sci. Technol. **2010**; 44(16):6102-6109

175. Hembrock-Heger A, NieSZner M, Reupert R *Tierarzneimittel in landwirtschaftlich genutzten Böden und oberflächennahem Grundwasser in Nordrhein-Westfalen*. *Bodenschutz* **2011**; 4:109-113
176. Tylová T, Kameník Z, Flieger M, Olšovská J *Comparison of LC Columns Packed with 2.6 µm Core-Shell and Sub-2 µm Porous Particles for Gradient Separation of Antibiotics*. *Chromatographia* **2011**; 74(1-2):19-27
177. Liguoro M de, Cibir V, Capolongo F, Halling-Sørensen B, Montesissa C *Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil*. *Chemosphere* **2003**; 52(1):203-212
178. Winckler C und Grafe A *Use of veterinary drugs in intensive animal production*. *J Soils Sediments* **2001**; 1(2):66-70
179. Schmitt H, Haapakangas H, van Beelen P *Effects of antibiotics on soil microorganisms: time and nutrients influence pollution-induced community tolerance*. *Soil Biology and Biochemistry* **2005**; 37(10):1882-1892
180. Leal RMP, Figueira RF, Tornisiello VL, Regitano JB *Occurrence and sorption of fluoroquinolones in poultry litters and soils from São Paulo State, Brazil*. *Science of The Total Environment* **2012**; 432(0):344-349
181. Ho YB, Zakaria MP, Latif PA, Saari N *Occurrence of veterinary antibiotics and progesterone in broiler manure and agricultural soil in Malaysia*. *The Science of the total environment* **2014**; 488-489:261-267
182. Wegst-Uhrich SR, Navarro DA, Zimmerman L, Aga DS *Assessing antibiotic sorption in soil: a literature review and new case studies on sulfonamides and macrolides*. *Chem Cent J* **2014**; 8(1):5
183. Tolls J *Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review*. *Environ. Sci. Technol.* **2001**; 35(17):3397-3406
184. Kladrivko EJ, van Scoyoc GE, Monke EJ, Oates KM, Pask W *Pesticide and Nutrient Movement into Subsurface Tile Drains on a Silt Loam Soil in Indiana*:264 **1991**.  
10.2134/jeq1991.00472425002000010043x
185. Karthikeyan KG und Bleam WF *Occurrence of antibiotics in wastewater effluents and their mobility in soils: a case study for Wisconsin* **2003**
186. Kay P, Blackwell PA, Boxall ABA *Column studies to investigate the fate of veterinary antibiotics in clay soils following slurry application to agricultural land*. *Chemosphere* **2005**; 60(4):497-507
187. Brown CD, Hodgkinson RA, Rose DA, Syers JK, Wilcockson SJ *Movement of pesticides to surface waters from a heavy clay soil*. *Pestic. Sci.* **1995**; 43(2):131-140
188. Drillia P, Dokianakis SN, Fountoulakis MS, Kornaros M, Stamatelatou K, Lyberatos G *On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: The example of the antibiotic sulfamethoxazole*. *Pharmaceuticals in the Environment* **2005**; 122(3):259-265
189. Zhang H und Huang C-H *Adsorption and oxidation of fluoroquinolone antibacterial agents and structurally related amines with goethite*. *Chemosphere* **2007**; 66(8):1502-1512
190. Unold M, Kasteel R, Groeneweg J, Vereecken H *Transport and transformation of sulfadiazine in soil columns packed with a silty loam and a loamy sand*. *Journal of Contaminant Hydrology* **2009**; 103(1-2):38-47
191. Boxall ABA, Blackwell P, Cavallo R, Kay P, Tolls J *The sorption and transport of a sulfonamide antibiotic in soil systems*. *Toxicology Letters* **2002**; 131(1-2):19-28
192. Lertpaitoonpan W, Ong SK, Moorman TB *Effect of organic carbon and pH on soil sorption of sulfamethazine*. *Chemosphere* **2009**; 76(4):558-564
193. Kwon J-W *Mobility of veterinary drugs in soil with application of manure compost*. *Bull Environ Contam Toxicol* **2011**; 87(1):40-44
194. Pan B, Ning P, Xing B *Part V--Sorption of pharmaceuticals and personal care products*. *Environmental science and pollution research international* **2009**; 16(1):106-116

195. Kay P, Blackwell PA, Boxall ABA *A lysimeter experiment to investigate the leaching of veterinary antibiotics through a clay soil and comparison with field data*. *Environmental Pollution* **2005**; 134(2):333-341
196. Stevens H *Untersuchungen zum Verhalten von Veterinärpharmaka im Boden*. Dissertation, Paderborn **2009**
197. Hamscher G *Tierarzneimittel in Boden, Sicker-und Grundwasser: Langzeituntersuchungen an Dauerbeobachtungsflächen in Nord-Deutschland 2000-2006: AGES-Akademie „Verhalten biologisch aktiver Risiko-substanzen in Boden und Grundwasser“*; Wien **2007**
198. Gong W, Liu X, He H, Wang L, Dai G *Quantitatively modeling soil–water distribution coefficients of three antibiotics using soil physicochemical properties*. *Chemosphere* **2012**; 89(7):825-831
199. Pils JRV und Laird DA *Sorption of Tetracycline and Chlortetracycline on K- and Ca-Saturated Soil Clays, Humic Substances, and Clay–Humic Complexes*. *Environ. Sci. Technol.* **2007**; 41(6):1928-1933
200. Chefetz B, Mualem T, Ben-Ari J *Sorption and mobility of pharmaceutical compounds in soil irrigated with reclaimed wastewater*. *Chemosphere* **2008**; 73(8):1335-1343
201. Graber ER und Gerstl Z *Review. Special Issue: Utilization of Effluents for Modern Irrigation*. *Israel Journal of Plant Sciences* **2011**; 59(2-4):105-114
202. Subbiah M, Mitchell SM, Ullmann JL, Douglas CR *Beta-lactams and florfenicol antibiotics remain bioactive in soils while ciprofloxacin, neomycin and tetracycline are neutralized*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**
203. Kim Y, Lim S, Han M, Cho J *Sorption characteristics of oxytetracycline, amoxicillin, and sulfathiazole in two different soil types*. *Geoderma* **2012**; 185–186(0):97-101
204. Yu Z, Yediler A, Yang M, Schulte-Hostede S *Leaching behavior of enrofloxacin in three different soils and the influence of a surfactant on its mobility*. *Journal of Environmental Sciences* **2012**; 24(3):435-439
205. Uslu MÖ, Yediler A, Balcioglu IA, Schulte-Hostede S *Analysis and Sorption Behavior of Fluoroquinolones in Solid Matrices*. *Water, Air, and Soil Pollution* **2008**; 190(1-4):55-63
206. Linz DG und Nakles DV *Environmentally acceptable endpoints in soil: risk-based approach to contaminated site management based on availability of chemicals in soil*. *American Academy of Environmental Engineers* **1997**
207. Lipnick RL, Hermens JL, Jones KC, Muir DC (Hrsg) *Accumulative, and Toxic Chemicals. I: Fate and Exposure. I: Fate and Exposure*. American Chemical Society, Washington, DC **2001**
208. Beckles DM, Chen W, Hughes JB *Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons sequestered in sediment: microbial study and model prediction*. *Environ Toxicol Chem* **2007**; 26(5):878-883
209. Smalla K, Binh CT, Kopmann C, Heuer H *Effekte von Veterinärantibiotika auf mikrobielle Gemeinschaften im Boden*. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutz* **2008**; 60(236)
210. Watanabe N, Bergamaschi BA, Loftin KA, Meyer MT, Harter T *Use and environmental occurrence of antibiotics in freestall dairy farms with manured forage fields*. *Environ. Sci. Technol.* **2010**; 44(17):6591-6600
211. Aust M-O, Godlinski F, Travis GR, Hao X, McAllister TA, Leinweber P, Thiele-Bruhn S *Distribution of sulfamethazine, chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle*. *Environ Pollut* **2008**; 156(3):1243-1251
212. Halling-Sorensen B, Jacobsen A-M, Jensen J, Sengelov G, Vaclavik E, Ingerslev F *Dissipation and effects of chlortetracycline and tylosin in two agricultural soils: a field-scale study in southern Denmark*. *Environ Toxicol Chem* **2005**; 24(4):802-810

213. Szatmári I, Barcza T, Körmöczy PS, Laczay P *Ecotoxicological assessment of doxycycline in soil*. Journal of Environmental Science and Health, Part B **2012**; 47(2):129-135
214. Landeamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (Hrsg) *Eintrag von Arzneimitteln und deren Verhalten und Verbleib in der Umwelt – Literaturstudie: LANUV- Fachbericht 2*, Recklinghausen **2007**
215. Andreu V, Vazquez-Roig P, Blasco C, Picó Y *Determination of tetracycline residues in soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem **2009**; 394(5):1329-1339
216. Eschenbach A und Oing K *Vortrag: Characterization of Nonextractable residues for their risk Assessment in soil with special regard to pharmaceuticals*. UBA international Workshop Pharmaceuticals in Soil, Sludge and Slurry, Dessau-Roßlau **2013**
217. Roberts T. R. *Non-extractable pesticide residues in soils and plants*. IUPAC Reports on Pesticides (17). Pure Appl. Chem. **1984**; 56(7):945-956
218. Goktas RK und Aral MM *Integrated Dynamic Modeling of Contaminant Fate and Transport within a Soil-Plant System*. gsvadzone **2011**; 10(4):1130-1150
219. Jones-Lepp TL, Sanchez CA, Moy T, Kazemi R *Method development and application to determine potential plant uptake of antibiotics and other drugs in irrigated crop production systems*. J. Agric. Food Chem. **2010**; 58(22):11568-11573
220. Boxall ABA, Johnson P, Smith EJ, Sinclair CJ, Stutt E, Levy LS *Uptake of Veterinary Medicines from Soils into Plants*. J. Agric. Food Chem. **2006**; 54(6):2288-2297
221. Xiao Q-M, Wang J-W, Tang Y-L *Degradation and bioaccumulation characteristics of ciprofloxacin in soil-vegetable system*. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao **2012**; 23(10):2708-2714
222. Eggen T, Asp TN, Grave K, Hormazabal V *Uptake and translocation of metformin, ciprofloxacin and narasin in forage- and crop plants*. Chemosphere **2011**; 85(1):26-33
223. Kumar K, Gupta SC, Baidoo SK, Chander Y, Rosen CJ *Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure*. J Environ Qual **2005**; 34(6):2082-2085
224. Wu C, Spongberg AL, Witter JD, Fang M, Czajkowski KP *Uptake of pharmaceutical and personal care products by soybean plants from soils applied with biosolids and irrigated with contaminated water*. Environ. Sci. Technol. **2010**; 44(16):6157-6161
225. Dolliver H, Kumar K, Gupta S *Sulfamethazine uptake by plants from manure-amended soil*. J Environ Qual **2007**; 36(4):1224-1230
226. Nerlich U *Transfer von Arzneimittelrückständen in Böden und Pflanzen über Wirtschaftsdünger tierischer Herkunft* **2009**
227. Boonsaner M und Hawker DW *Accumulation of oxytetracycline and norfloxacin from saline soil by soybeans*. Science of The Total Environment **2010**; 408(7):1731-1737
228. Rein A, Legind CN, Trapp S *New concepts for dynamic plant uptake models*. SAR and QSAR in environmental research **2011**; 22(1-2):191-215
229. Sandermann H, JR *Plant metabolism of xenobiotics*. Trends in biochemical sciences **1992**; 17(2):82-84
230. Trapp S und McFarlane JC *Plant contamination: Modeling and simulation of organic chemical processes*. Lewis Publishers, Boca Raton **1995**
231. Grote M, Schwake-Anduschus C, Michel R et al. *Aufnahme und Transport von Tierarzneistoffen in Nutzpflanzen*. In: *Münchener Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie*. In: Tierarzneimittel in der Umwelt [Vorträge der 58. Fachtagung "Tierarzneimittel in der Umwelt"], 161-173
232. Gottschall N, Topp E, Metcalfe C, Edwards M, Payne M, Kleywegt S, Russell P, Lapen DR *Pharmaceutical and personal care products in groundwater, subsurface drainage, soil, and wheat grain, following a high single application of municipal biosolids to a field*. Chemosphere **2012**; 87(2):194-203



233. Sabourin L, Duenk P, Bonte-Gelok S, Payne M, Lapen DR, Topp E *Uptake of pharmaceuticals, hormones and parabens into vegetables grown in soil fertilized with municipal biosolids*. Science of The Total Environment **2012**; 431(0):233-236
234. Marsoni M, Mattia F de, Labra M, Bruno A, Bracale M, Vannini C *Uptake and effects of a mixture of widely used therapeutic drugs in Eruca sativa L. and Zea mays L. plants*. Ecotoxicology and Environmental Safety **2014**; 108(0):52-57
235. Goldstein M, Shenker M, Chefetz B *Insights into the Uptake Processes of Wastewater-Borne Pharmaceuticals by Vegetables*. Environ. Sci. Technol. **2014**; 48(10):5593-5600
236. Hawker DW, Cropp R, Boonsaner M *Uptake of zwitterionic antibiotics by rice (Oryza sativa L.) in contaminated soil*. Journal of Hazardous Materials **2013**; 263, Part 2(0):458-466
237. Michelini L, Reichel R, Werner W, Ghisi R, Thiele-Bruhn S *Sulfadiazine Uptake and Effects on Salix fragilis L. and Zea mays L. Plants*. Water Air Soil Pollut **2012**; 223(8):5243-5257
238. Ahmed MBM, Rajapaksha AU, Lim JE, Vu NT, Kim IS, Kang HM, Lee SS, Ok YS *Distribution and Accumulative Pattern of Tetracyclines and Sulfonamides in Edible Vegetables of Cucumber, Tomato, and Lettuce*. J. Agric. Food Chem. **2015**; 63(2):398-405
239. Rajapaksha AU, Vithanage M, Lim JE, Ahmed MBM, Zhang M, Lee SS, Ok YS *Invasive plant-derived biochar inhibits sulfamethazine uptake by lettuce in soil*. Chemosphere **2014**; 111(0):500-504
240. Chowdhury F *Untersuchungen zur Aufnahme von Antibiotika in Rotkohl und Möhren: Verbreitungspfade und Verbraucherrisiken*, Paderborn **2012**
241. Hamscher G, Pawelzick HT, Sczesny S, Nau H, Hartung J *Antibiotics in dust originating from a pig-fattening farm: a new source of health hazard for farmers?* Environmental Health Perspectives **2003**; 111(13):1590-1594
242. Kühne M und Körner U *Bound chlortetracycline residues in bones: release under acidic conditions*. Food Chemistry **2001**; 72(1):41-44
243. Kühne M, Wegmann S, Kobe A, Fries R *Tetracycline residues in bones of slaughtered animals*. Food Control **2000**; 11(3):175-180
244. Hamscher G *Langzeituntersuchungen des Grundwassergefährdungspotenzials von Tierarzneimitteln am Beispiel der Sulfonamide: 4. Innovationsforum Wasserwirtschaft, Bad Honnef* **2013**
245. van Rennings L, Munchhausen C von, Otilie H, Hartmann M, Merle R, Honscha W, Kasbohrer A, Kreienbrock L *Cross-sectional study on antibiotic usage in pigs in Germany*. PLoS One **2015**; 10(3):e0119114
246. Zadoks JC, Chang T, Konzak CF *A decimal code for the growth stages of cereals*. Weed Research **1974**; (14 (6)):415-421
247. Meier U *Entwicklungsstadien mono- und dikotylar Pflanzen, BBCH-Monografie*, Gemeinschaftsarbeit der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA), des Bundessortenamtes (BSA) und des Industrieverbandes Agrar (IVA) unter Mitwirkung anderer Institutionen **2001**
248. Meriç DH *Untersuchungen zur Aufnahme und zum Transport antibiotisch wirksamer Stoffe in Getreide- und Gemüsepflanzen*. Dissertation, Paderborn **2010**
249. Vockel A *Bestimmung von Chlortetracyclinrückständen in biologischen Proben aus der landwirtschaftlichen Tierhaltung mit HPLC-UV-MS/MS: - Methodenentwicklung und Anwendung in Medikationsstudien -*. Dissertation, Paderborn **2005**
250. *Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen: 2002/657/EG* Entsch:2002-08-12. In: Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften

251. Batchelor M, Hopkins K, Threlfall EJ, Clifton-Hadley FA, Stallwood AD, Davies RH, Liebana E *bla(CTX-M) genes in clinical Salmonella isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **2005**; 49(4):1319-1322
252. Guerra B, Soto SM, Arguelles JM, Mendoza MC *Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent Salmonella enterica serotype 4,5,12:i:-*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **2001**; 45(4):1305-1308
253. Weill F-X, Demartin M, Tande D, Espie E, Rakotoarivony I, Grimont, Patrick A D *SHV-12-like extended-spectrum-beta-lactamase-producing strains of Salmonella enterica serotypes Babelsberg and Enteritidis isolated in France among infants adopted from Mali*. Journal of clinical microbiology **2004**; 42(6):2432-2437
254. Zhao S, White DG, McDermott PF, Friedman S, English L, Ayers S, Meng J, Maurer JJ, Holland R, Walker RD *Identification and expression of cephamycinase bla(CMY) genes in Escherichia coli and Salmonella isolates from food animals and ground meat*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **2001**; 45(12):3647-3650
255. Kreienbrock L, Kreienbrock L (Hrsg) *ESBL und Fluorchinolon-Resistenz in Enterobacteriaceae: Schlussbericht an das Deutsche Zentrum für Luft und Raumfahrt e.V., DLR 2010 - 2013*
256. Rijk Zwaan *Produkte und Service Porree*.  
[http://www.rijkszwaan.de/wps/wcm/connect/RZ+DE/Rijk+Zwaan/Products\\_and\\_Services/Products/Other+crops/Porree?pcpage=3&frm=1&var-name=MATEJKO%20RZ%20F1%20%2838-300%29&his=c293LHVuZ-GVmaW5lZCwwO2hhcnYsdW5kZWZpbmVkLDA7cGxhbnQsdW5kZWZpbmVkLDA7cmFkaW9zY2hlZCxoYXJ2LDA7](http://www.rijkszwaan.de/wps/wcm/connect/RZ+DE/Rijk+Zwaan/Products_and_Services/Products/Other+crops/Porree?pcpage=3&frm=1&var-name=MATEJKO%20RZ%20F1%20%2838-300%29&his=c293LHVuZ-GVmaW5lZCwwO2hhcnYsdW5kZWZpbmVkLDA7cGxhbnQsdW5kZWZpbmVkLDA7cmFkaW9zY2hlZCxoYXJ2LDA7), zuletzt geprüft am 25.01.2016
257. Rijk Zwaan *Produkte und Service Weißkohl Ancoma*.  
[http://www.rijkszwaan.de/wps/wcm/connect/RZ+DE/Rijk+Zwaan/Products\\_and\\_Services/Products/Cabbage/Kopfkohl?pcpage=3&frm=1&var-name=ANCOMA%20RZ%20F1&his=dHlwZSx3aGl0ZSwyO3Nvdix1bmRlZmluZWQsMDtoYXJ2LHVuZGVmaW5lZCwwO3BsYW50LHVuZ-GVmaW5lZCwwO3JhZGlvc2NoZWQsaGFydiwwOw==](http://www.rijkszwaan.de/wps/wcm/connect/RZ+DE/Rijk+Zwaan/Products_and_Services/Products/Cabbage/Kopfkohl?pcpage=3&frm=1&var-name=ANCOMA%20RZ%20F1&his=dHlwZSx3aGl0ZSwyO3Nvdix1bmRlZmluZWQsMDtoYXJ2LHVuZGVmaW5lZCwwO3BsYW50LHVuZ-GVmaW5lZCwwO3JhZGlvc2NoZWQsaGFydiwwOw==), zuletzt geprüft am 25.01.2016
258. Jacob T *Der Kleine Garten: Kohlgemüse anbauen*. Internetprojekt. <http://www.der-kleinegarten.de/nutzgarten-kleingarten/gemuesegarten-anlegen/kohl-gemuese/kohl-im-garten-anbauen.html>, zuletzt geprüft am 26.01.2016
259. Jacob T *Der Kleine Garten: Die Wurzelsysteme der Gemüsepflanzen*. Internetprojekt. <http://www.derkleinegarten.de/nutzgarten-kleingarten/gemuesegarten-anlegen/anbauplan-permakultur/wurzelsysteme.html>, zuletzt geprüft am 25.01.2016
260. Kempf I und Zeitouni S. *The cost of antibiotic resistance: Analysis and consequences*. Pathologie Biologie **2012**; (60):e9-e14
261. Chee-Sanford J.C. J, Mackie R, Koike S, Krapac I, Lin Y-F, Yannarell A, Maxwell S, Aminov RI *Fate and Transport of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance Genes following Land Application of Manure Waste*. J. Environ. Qual **2009**; (38):1086-1108
262. Wright G *The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity*. nature reviews microbiology **2007**; (5):175-186
263. Prof. Dr. Mechthild Freitag und FH Südwestfalen. mündlich
264. Gilbertson TJ, Roof RD, Nappier JL, Zaya MJ, Robins RH, Stuart DJ, Krzeminski LF, Jaglan PS *Disposition of Ceftiofur Sodium in Swine following Intramuscular Treatment*. J. Agric. Food Chem. **1995**; 43(1):229-234
265. Beconi-Barker MG, Roof RD, Millerioux L, Kausche FM, Vidmar TH, Smith EB, Callahan JK, Hubbard VL, Smith GA, Gilbertson TJ *Determination of ceftiofur and its desfu-roylceftiofur-related metabolites in swine tissues by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography **1995**; 673(2):231-244

266. Becker M *LC-MS/MS-Methoden zur Rückstandsanalyse von Penicillinen, Cephalosporinen und Aminoglycosid-Antibiotika*. Dissertation, Wuppertal **2005**
267. Jaglan P, Kubicek M, Arnold T, Cox B, Robins R, Johnson D, Gilbertson T *Metabolism of ceftiofur. Nature of urinary and plasma metabolites in rats and cattle*. J. Agric. Food Chem. **1989**; 37(4):1112-1118
268. Beconi-Barker MG, Smith EB, Arnold TS, Hornish RE, Vidmar TJ, Gatchell CL *Metabolism of [14C]Ceftiofur Hydrochloride in Swine after Intramuscular Injections*. J. Agric. Food Chem. **1997**; 45(7):2606-2611
269. Beconi-Barker MG, Davison KL, Hornish RE, Arnold TS, Craigmill AL, Gilbertson TJ, Smith EB, Vidmar TJ, Hoffman GA, Gatchell CL *[14C]Ceftiofur Sodium Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion in Sheep following Intramuscular Injections*. J. Agric. Food Chem. **1995**; 43(6):1589-1597
270. Olson SC, Beconi-Barker MG, Smith EB, Martin RA, Vidmar TJ, Adams LD *In vitro metabolism of ceftiofur in bovine tissues*. J Vet Pharmacol Ther **1998**; 21(2):112-120
271. Beyer A *Veränderung kommensaler Escherichia coli beim Schwein unter der Behandlung mit Ceftiofur*. Dissertation, Leipzig **2014**
272. Hornish RE und Kotarski SF *Cephalosporins in veterinary medicine - ceftiofur use in food animals*. Curr Top Med Chem **2002**; 2(7):717-731
273. Li X, Zheng W, Machesky ML, Yates SR, Katterhenry M *Degradation Kinetics and Mechanism of Antibiotic Ceftiofur in Recycled Water Derived from a Beef Farm*. J. Agric. Food Chem. **2011**; 59(18):10176-10181
274. Feng S, Chattopadhyaya C, Kijak P, Chiesa OA, Tall EA *A determinative and confirmatory method for ceftiofur metabolite desfuroylceftiofur cysteine disulfide in bovine kidney by LC-MS/MS*. Journal of Chromatography B **2012**; 898:62-68
275. Berendsen BJ, Essers ML, Mulder PP, van Bruchem GD, Lommen A, van Overbeek WM, Stolker LA *Newly identified degradation products of ceftiofur and cephalixin impact the analytical approach for quantitative analysis of kidney*. Journal of Chromatography A **2009**; 1216(46):8177-8186
276. Witte TS, Iwersen M, Kaufmann T, Scherpenisse P, Bergwerff AA, Heuwieser W *Determination of ceftiofur derivatives in serum, endometrial tissue, and lochia in puerperal dairy cows after subcutaneous administration of ceftiofur crystalline free acid*. Journal of dairy science **2011**; 94(1):284-290
277. Makeswaran S, Patterson I, Points J *An analytical method to determine conjugated residues of ceftiofur in milk using liquid chromatography with tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta **2005**; 529(1-2):151-157
278. Meier B *Entwicklung und Anwendung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Cefalexin, Ceftiofur und Desfuroylceftiofur in Milch*. Dissertation, Gießen **2007**
279. Unmann F *Nachteile der Bodenarten*
280. Scheffer F *Lehrbuch der Bodenkunde / Scheffer-Schachtschabel*. Enke, Stuttgart **1979**
281. Leal RMP, Alleoni, Luis Reynaldo Ferracciú, Tornisielo VL, Regitano JB *Sorption of fluoroquinolones and sulfonamides in 13 Brazilian soils*. Chemosphere **2013**; 92(8):979-985
282. Kotzerke A, Fulle M, Sharma S, Kleinedam K, Welzl G, Lamshöft M, Schlöter M, Wilke B-M *Alterations in total microbial activity and nitrification rates in soil due to amoxicillin-spiked pig manure*. Z. Pflanzenernähr. Bodenk. **2011**; 174(1):56-64
283. Vries-Hospers H de, Jansen G, Tonk R, Oenema D, van der Waaij D *The in vitro inactivation of thirteen beta-lactam antibiotics by other mechanisms than adsorption to faecal substance*. Infection **1993**; 21(2):127-130
284. Gozlan I, Rotstein A, Avisar D *Investigation of an amoxicillin oxidative degradation product formed under controlled environmental conditions*. Environ. Chem. **2010**; 7(5):435

285. Huq F *Molecular Modelling Analysis of the Metabolism of Ceftiofur*. J. of Pharmacology and Toxicology **2007**; 2(4):340-349
286. Koshy K und Cazers A *Controlled hydrolysis of ceftiofur sodium, a broad-spectrum cephalosporin; isolation and identification of hydrolysis products*. Journal of Pharmaceutical Sciences **1997**; 86(3):389-395
287. Lim Y-H, Park D-H, Youn Y-Y, Kim K-H, Cho H-S *Identification of Ceftiofur Oxidation Products by High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization/Tandem Mass Spectrometry*. Mass Spectrometry Letters **2011**; 2(1):16-19
288. Trovó AG, Pupo Nogueira RF, Agüera A, Fernandez-Alba AR, Malato S *Degradation of the antibiotic amoxicillin by photo-Fenton process – Chemical and toxicological assessment*. Water Research **2011**; 45(3):1394-1402
289. Liu H, Sadygov RG, Yates JR3 *A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics*. Anal Chem **2004**; 76(14):4193-4201
290. Ghaemmamghami S, Huh W-K, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS *Global analysis of protein expression in yeast*. Nature **2003**; 425(6959):737-741
291. Old WM *Comparison of Label-free Methods for Quantifying Human Proteins by Shotgun Proteomics*. Molecular & Cellular Proteomics **2005**; 4(10):1487-1502
292. Berendsen BJ, Stolker LA, Nielen MW *Assessment of liquid chromatography–tandem mass spectrometry approaches for the analysis of ceftiofur metabolites in poultry muscle*. Food Additives & Contaminants: Part A **2012**; 29(2):197-207
293. Lecaillon JB, Rouan MC, Souppart C, Febvre N, Juge F *Determination of cefsulodin, cefotiam, cephalixin, cefotaxime, desacetyl-cefotaxime, cefuroxime and cefroxadin in plasma and urine by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications **1982**; 228:257-267
294. Gozlan I, Rotstein A, Avisar D *Amoxicillin-degradation products formed under controlled environmental conditions: Identification and determination in the aquatic environment*. Chemosphere **2013**; 91(7):985-992
295. Pérez-Lozano P, García-Montoya E, Orriols A, Miñarro M, Ticó J, Suñé-Negre J *Stability evaluation of amoxicillin in a solid premix veterinary formulation by monitoring the degradation products through a new HPLC analytical method*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **2006**; 42(2):192-199
296. Nägele E und Moritz R *Structure elucidation of degradation products of the antibiotic amoxicillin with ion trap MSn and accurate mass determination by ESI TOF*. J Am Soc Mass Spectrom **2005**; 16(10):1670-1676
297. Shimadzu *Analysis of Amoxicillin using the LCMS-2010EV and the LCMS-IT-TOF*. [http://www2.shimadzu.com/apps/appnotes/SSI\\_AP\\_LCMSITTOF1\\_Amoxicillin.pdf](http://www2.shimadzu.com/apps/appnotes/SSI_AP_LCMSITTOF1_Amoxicillin.pdf), zuletzt geprüft am 09.04.2014
298. Koike S, Krapac IG, Oliver HD, Yannarell AC, Chee-Sanford JC, Aminov RI, Mackie RI *Monitoring and source tracking of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater adjacent to swine production facilities over a 3-year period*. Applied and environmental microbiology **2007**; 73(15):4813-4823
299. Rahube TO und Yost CK *Characterization of a mobile and multiple resistance plasmid isolated from swine manure and its detection in soil after manure application*. Journal of applied microbiology **2012**; 112(6):1123-1133
300. Yang Q, Ren S, Niu T, Guo Y, Qi S, Han X, Liu D, Pan F *Distribution of antibiotic-resistant bacteria in chicken manure and manure-fertilized vegetables*. Environmental science and pollution research international **2014**; 21(2):1231-1241
301. Trapp S, Franco A, Mackay D *Activity-Based Concept for Transport and Partitioning of Ionizing Organics*. Environ. Sci. Technol. **2010**; 44(16):6123-6129
302. Carter LJ, Harris E, Williams M, Ryan JJ, Kookana RS, Boxall ABA *Fate and Uptake of Pharmaceuticals in Soil–Plant Systems*. J. Agric. Food Chem. **2014**; 62(4):816-825

303. Hamilton-Miller, J. M. T und Shah S *Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables*. International journal of antimicrobial agents **2001**; 18(1):81-83
304. RESET, Kreienbrock L (Hrsg) *ESBL and (fluoro)quinolone Resistance in Enterobacteriaceae: Report and application for second funding period 2014 - 2016 (as of 10th May 2013)*. Resubmission, Hannover **2013**
305. Landeslabor Berlin-Brandenburg *Verfahrensanweisung VA 8 - 0004 - 02* **2013**
306. Thompson M, Ellison SLR, Wood R *Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis: (IUPAC Technical Report)*. Resulting from the Symposium on Harmonization of Quality Assurance Systems for Analytical. Pure Appl. Chem. **2002**; 74(5):835-855
307. Generaldirektion Gesundheit und Verbraucher (SANCO), EU-Kommission (Hrsg) *method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed: Document No. SANCO/10684/2009*. Supersedes Document No. SANCO/3131/2007 **2010**
308. Stefanka Bratinova BRCS, European Commission Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection (Hrsg) *Guidelines for performance criteria and validation procedures of analytical methods used in controls of food contact materials*. EUR 24105 EN - 1st edition 2009. JRC Scientific and Technical Reports **2009**
309. Schwake-Anduschus C *Untersuchungen zur Aufnahme von Antibiotika durch Nutzpflanzen*. Dissertation, Paderborn **2008**

## Anhang: experimenteller Teil

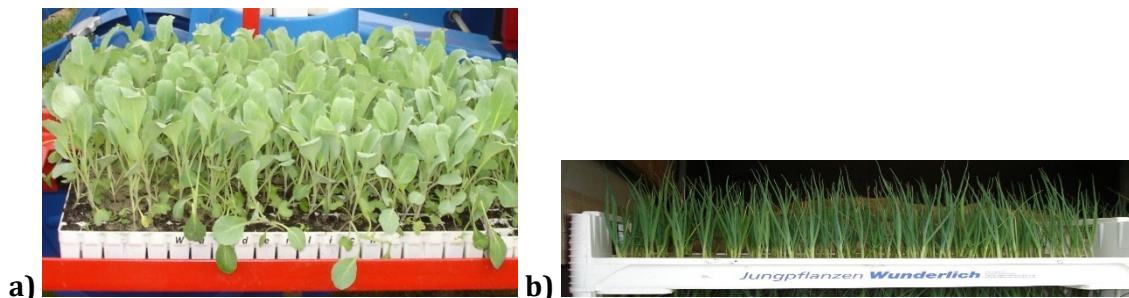
---

### A. Feldversuche

#### A.1. Anbauperiode 2011

##### *Pflanzung der Weißkohl- und Porree-Jungpflanzen 2011*

Die Jungpflanzen befanden sich vor ihrer Pflanzung in Anzuchtkästen. Zum Zeitpunkt der Pflanzung trugen die jungen Weißkohlpflanzen noch ihre Keimblätter und hatten ca. vier Laubblätter entwickelt. Nach der BBCH-Codierung (**B**iologische **B**undesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, **B**undessortenamt und **C**hemische Industrie), die die phänologischen Entwicklungsstadien von bestimmten Pflanzen bzw. Pflanzengruppen angibt, hatten die Pflanzen zum Zeitpunkt der Pflanzung die Codierung 14, d.h. sie befanden sich im Makrostadium 1, im Stadium der Blattentwicklung des Hauptsprosses. Die Jungpflanzen des Porrees wiesen keine Keimblätter mehr auf und hatten bereits ca. drei Laubblätter gebildet, nach BBCH befanden sie sich im Makrostadium 1, Codierung 13.



**Abbildung 43: Jungpflanzen in Anzuchtkästen**

**a) Weißkohlpflanzen b) Porreepflanzen.**

Die Jungpflanzen wurden in Anzuchtkästen geliefert. (zwei Anzuchtkästen mit jeweils 300 Weißkohlpflänzchen (Pflanzensorte Speedys); (sieben Anzuchtkästen mit jeweils 300 Porreepflänzchen (Standardsorte Septemberernte).

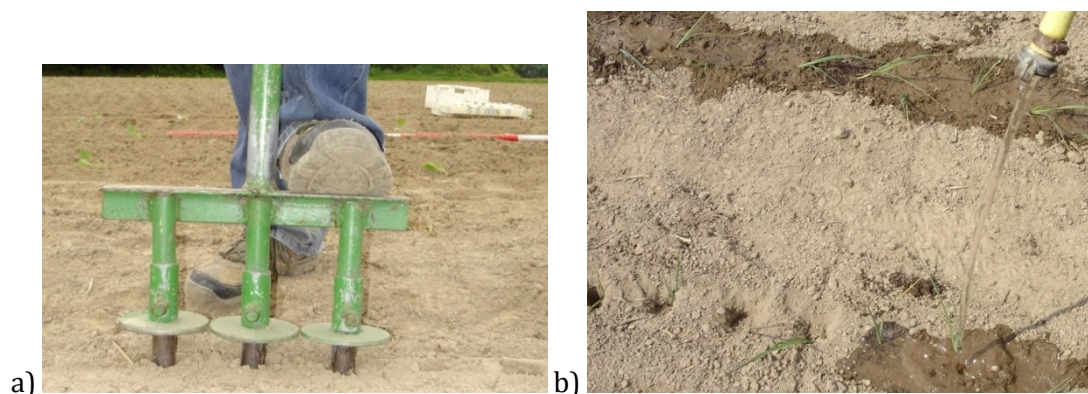
Um die Beschaffenheit des Bodens für die Bepflanzung zu optimieren, wurde der Boden ge-  
fräst. Es wurden 8 Parzellen je Pflanzenart bepflanzt. Es wurden 480 Weißkohl- und 2016  
Porreepflanzen gepflanzt.



**Abbildung 44: Pflanzmaschine (Versuchsfeld Merklingsen, 12.05.2011)**

Die Pflanzung für Weißkohl erfolgte mithilfe einer Pflanzmaschine (Abbildung 44), die von einem Mitarbeiter der Firma Rijkzwaan gefahren wurde. Anschließend wurden die Pflanzen bewässert. Für die Porreepflanzung wurde die zu bepflanzende Flächen gewalzt und die Pflanzreihen markiert. Die Firma Rijkzwaan stellte außerdem einen Pflanzstab zur Verfügung (siehe Abbildung 45a). Mit diesem Pflanzstab (3 Stäben im Abstand von 10 cm mit einer Länge von 15 cm) wurden die Pflanzlöcher für Porree in dem für den Porreeanbau üblichen Abstand und der üblichen Tiefe gestochen. Die Porreepflanzen wurden von Hand in die Löcher eingesetzt und mit Wasser eingeschlämmt (Abbildung 45b).

Je nach Bedarf wurden die Pflanzen bis zur Ernte bewässert. Die Bewässerung konnte durch das Kohnetz (siehe Kapitel Pflanzenschutz 2011) in den ersten 3 Monaten in der Regel etwa alle 2 Tage mit jeweils ca. 3500 l Wasser erfolgen.



**Abbildung 45: Porreepflanzung 2011: a) Dreizack zum Stechen der Pflanzlöcher für die Porreesetzlinge; b) Einschlämmen der Porreepflanzen**

## Düngung 2011

Die Berechnung der erforderlichen Gülle pro m<sup>2</sup> Parzelle zur Grunddüngung von Weißkohl und Porree ist abhängig vom Ammonium-Stickstoffgehalt in der Gülle bzw. im Kot und der vorhandenen Stickstoffkonzentration (N<sub>min</sub>) in der Erde, in der die Jungpflanzen gepflanzt wurden. Die Berechnung der Menge an Gülle bzw. Kot erfolgte anhand des üblichen Stickstoffgehalts und der Trockensubstanz. Es wurde bei der Gülle von einem Stickstoffgehalt von 5,6 kg/m<sup>3</sup> und von einer Trockensubstanz von 5% ausgegangen. Da die Gülle bzw. der Kot erst kurz vor dem Düngetermin abgeholt wurde, konnte der Stickstoffgehalt nicht im Vorhinein bestimmt werden. Weißkohlpflanzen benötigen zum Gedeihen insgesamt 290 kg N/ha, Porreepflanzen insgesamt 200 kg N/ha, wobei nicht alles an einem Tag aufgebracht wird, sondern zu mehreren Zeitpunkten je nach Bedarf. Bei einem üblichen Stickstoffgehalt werden 2 L/m<sup>2</sup> Gülle aufgebracht. Die späteren Untersuchungen ergaben einen Stickstoffgehalt in der Gülle von 0,15% bei einer Trockensubstanz von 2,7%. Der Stickstoffgehalt des verdünnten Hühnerkots lag bei 0,49% und die Trockensubstanz bei 5%. Alle Untersuchungen wurden von der LUFA NRW durchgeführt. Nach Erhalt der Ergebnisse von der LUFA erfolgte eine weitere antibiotikafreie Güllendüngung für den Porree. Die Weißkohlpflanzen waren bereits so groß, dass eine Kontamination der Blätter mit Gülle nicht ausgeschlossen werden konnte. Aus diesem Grund wurde auf eine zweite organische Düngung beim Weißkohl verzichtet. Nach sechs und acht Wochen erfolgten zwei mineralische Düngungen, so dass die Pflanzen insgesamt einen Stickstoffgehalt von 240 kg zur Verfügung hatten.

### Tabelle 35: Aufwandmenge an Wirtschaftsdünger.

Der Kot wurde auf 5 % Trockensubstanz mit Wasser verdünnt, d.h. es wurden 1,5 kg Kot mit 6,5 l Wasser für die Porreeparzellen und 2 kg Kot mit 9 l Wasser für die Weißkohlpzellen verrührt.

	Weißkohl	Porree	Antibiotikadotierung
<b>Gülle</b> (2 l / m <sup>2</sup> ):	36 l / Parzelle	27 l / Parzelle	75 mg/l = 150 mg/m <sup>2</sup>
<b>Kot</b> (0,655 kg / m <sup>2</sup> ):	12 kg / Parzelle	9kg / Parzelle	40 mg/l = 150 mg/m <sup>2</sup>

Die Düngung erfolgte mit der Gießkanne. In einer 15 L Gießkanne wurden 6 – 10 L Gülle bzw. verdünnter Hühnerkot mit der jeweiligen Menge an Antibiotika und Bakterien versetzt (siehe Tabelle 37). Diese Mischung wurde in einer zuvor gezogenen Rille nah an der Pflanzreihe auf die Parzellen aufgebracht. Anschließend wurde diese Rille mithilfe einer Gartenharke wieder mit Erde abgedeckt. (Abbildung 16).



**Tabelle 36: Antibiotikallösungen zur Dotierung der Tierexkremente 2011**

Antibiotikum*	Bezugsquelle/ Hersteller	Anteil reiner Wirkstoff (w/w)	Lösungsmittel	Ange-setztes Volumen	Menge Antibiotikum
<b>Amoxicillin-Trihydrat</b>	Klat-Chemie GmbH Ahlhorn	87 %	Voll ent-salztes Wasser	14 L	10,9 g
<b>Tetracyclin-Hydrochlorid</b>	Klat-Chemie GmbH Ahlhorn	92,4 %	Methanol	0,7 L	10,2 g
<b>Enrofloxacin-Base</b>	Zhejiang Xinhua Pharmaceutical Co., Ltd., Chinesische Produktion	99,4 %	Methanol	1,4 L	9,5 g

\* Herrn Dr. Bode wird für die Unterstützung bei der Beschaffung der Antibiotika gedankt.

**Tabelle 37: Angesetzte Mischungen der Tierexkremente mit Antibiotika und Bakterien für die Düngung 2011.**

Es wurden 150 mg/m<sup>2</sup> Antibiotikum und 2 L/m<sup>2</sup> Schweingülle bzw. 0,655 kg/m<sup>2</sup> Hühnerkot pro Parzelle aufgebracht. Das Volumen der Gießkanne betrug 15 L.

Variante	Pflanze	Tierexkrement	Antibiotikum	Anzahl Gießkannen pro Parzelle	Menge Tierexkrement pro Gießkanne	Volumen Wasser pro Gießkanne	Volumen Antibiotikallösung (siehe Tabelle 36) pro Gießkanne	Volumen Bakterien-suspension pro Gießkanne (ESBL- <i>E.coli</i> 10 <sup>3</sup> /mL KbE)
1	Porree	Schweine-gülle	AMO	3	9 L	-	1000 mL	9 mL
2			TC				50 mL	
3			ENR				100 mL	
4			oD				-	
5		Hühner-kot	AMO	6	1,5 kg	6,5 L	500 mL	6 mL
6			TC				25 mL	6 mL
7			ENR				50 mL	6 mL
8			oD				-	-
9	Weißkohl	Schweine-gülle	AMO	6	6 L	-	650 mL	6 mL
10			TC			-	30 mL	
11			ENR			-	65 mL	
12			oD			-	-	
13		Hühner-kot	AMO	6	2 kg	9 L	650 mL	11 mL
14			TC				30 mL	11 mL
15			ENR				65 mL	11 mL
16			oD				-	-

## A.2. Anbauperiode 2012

In der Anbauperiode 2012 wurden Porree und Weißkohl von Hand gepflanzt. Porree in einem Abstand von 10 cm und Weißkohl in einem Abstand von 60 cm in der Reihe.



Abbildung 46: Pflanzung von Porree und Weißkohl 2012

Tabelle 38: Antibiotikallösungen zur Dotierung der Schweinegülle 2012

Antibiotikum	Bezugsquelle/ Hersteller	Anteil reiner Wirkstoff (w/w)	Lösungsmittel	Einwaage Antibiotikum	Ange-setztes Volumen
Amoxicillin-Trihydrat	Klat-Chemie GmbH Ahlhorn	87 %	voll-ent-salztes Wasser	4,65 g	6 L
Ceftiofur-Hydrochlorid	Albrecht GmbH	92,5 %	Methanol	4,37 g	1 L
Enrofloxacin-Base	Zhejiang Xinhua Pharmaceutical Co., Ltd.; chinesische Produktion	99,4 %	Methanol	4,05 g	1 L

Tabelle 39: Angesetzte Mischungen der Schweinegülle mit Antibiotika und Bakterien für die Düngung

Es wurde 150 mg/m<sup>2</sup> Antibiotikum und 2 L/m<sup>2</sup> Schweinegülle pro Parzelle aufgebracht. Die eingefüllte Güllemenge pro Gießkanne betrug 9 L. Pro Gießkanne wurden 9 mL einer Bakteriensuspension (ESBL-*E. coli* 10<sup>3</sup>/mL KbE) hinzugegeben.

Variante	Pflanze	Antibiotikum	Anzahl Gießkannen pro Parzelle	Volumen Antibiotikallösung (siehe Tabelle 38) pro Gießkanne
1	Porree	AMO	2	1000 mL
2		CEF		170 mL
3		ENR		170 mL
4		oD		-
5	Weißkohl	AMO	4	1000 mL
6		CEF		170 mL
7		ENR		170 mL
8		oD		-



**Abbildung 47: Düngung 2012 (Fotos: M. Grote)**

Die Parzellen wurden mit der Gießkanne begüßt und anschließend wurde die Gülle eingeharkt.

## B. Antibiotikarückstandsanalytik

### B.1. Chemikalien

Acetonitril (HPLC Grade; Merck)  
 Ameisensäure reinst, 98-100 % (Merck)  
 Ammoniaklösung, 25% (w/w; p.a.; Merck)  
 Amoxicillin Trihydrat (VETRANAL, Fluka)  
 Ceftiofur (Analytical Standard, Fluka)  
 Ciprofloxacin (Reference Standard; Bayer AG)  
 Citronensäure Monohydrat (p.a. Merck)  
 Dithioerythritol (p.a. Sigma)  
 Diketopiperazin (LGC GmbH)  
 Di-Natriumhydrogenphosphat-2-Hydrat (p.a. Merck)  
 Enrofloxacin (Analytical Standard; Fluka)  
 Epi-Tetracyclin Hydrochlorid (Analytical Standard; Fluka)  
 Ethylendiamintetraessigsäure Dihydrat Dinatriumsalz, EDTA (Triplex III; p.a.; Merck)  
 Iodacetamid (p.a. Sigma)  
 Kaliumchlorid (chemsolute, Th. Geyer)  
 Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; p.a.; Merck)  
 Kaliumphosphat ( $\text{K}_3\text{PO}_4$ ; p.a. Sigma-Aldrich)  
 Koffein (Sigma-Aldrich/Steinheim)  
 Lithiumtetraborat (Merck)  
 Magnesiumnitrat Hexahydrat ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; p.a.; AppliChem)  
 Methanol (HPLC-gradient grade; VWR)  
 Natriumhydroxid (p.a.; Merck/Darmstadt)  
 Penicilloinsäure von Amoxicillin-Natriumsalz (LGC GmbH)  
 Phosphorsäure (85%; VWR)  
 Pufferlösungen, pH 2 und pH 7 (gebrauchsfertig; Merck)  
 Salzsäure, 25 % (w/w; p.a.; Merck)  
 Tetracyclin Hydrochlorid (Analytical Standard; Fluka)  
 Trichloressigsäure, TCA (Merck)  
 Ultramark (Alfa Aesar Lancaster/Pelham (Großbritannien))

## **B.2. Verbrauchsmaterialien**

50 mL Spritzen (Norm-Ject, Henke Sass Wolf)  
Analytische Trennsäule, YMC ODS-AM 5 µm 150 x 3 mm (YMC Europe GmbH)  
Analytische Vorsäule, YMC ODS-AM 5 µm 20 x 3 mm (YMC Europe GmbH)  
Deckel für Probengläschen (RSC) Pasteurpipetten, (VWR)  
Kartusche Bond C18 200 mg 3 mL (Varian; Part.Nr. 12102025)  
Messkolben 10 mL, Duran-Glas (VWR, Brand)  
Pasteurpipetten (VWR, Brand)  
Polymerphasen-Kartuschen: Oasis HLB 3cc 60 mg (Waters, Art.Nr.: WAT094226)  
Polymerphasen-Kartuschen: Oasis HLB 6cc 200 mg (Waters, Art.Nr.: WAT106202)  
Probenbeutel 540 mL (VWR, Twist-Seal)  
Probengläschen, (VWR)  
Reagenzgläser, (RSC)  
Zentrifugengläser 50 mL (VWR, Duran-Glas)

## **B.3. Laborgeräte**

beheizbares Sandbad für das Königswasserbad (LHG)  
Digitalwaage CP622 (Sartorius)  
Feinwaage handy (Sartorius)  
Grindomix (Retsch)  
Horizontalschüttler (IKA Labortechnik)  
Magnetrührer RH basic 2 (IKA)  
Metallblockthermostat (VLM)  
OPI-System (over pressure inline) (RSC)  
pH-Meter (Knick)  
Schüttler (Eppendorf)  
Ultraschallbad (VWR)  
Zentrifuge Rotofix 32 (Rettich)

## **B.4. Vorbehandlung der Labor- und Glasgeräte**

Um Kontaminationen aus Vorversuchen zu vermeiden, wurden alle Glasgeräte im Königswasserbad dekontaminiert und anschließend gründlich mit bidest. Wasser gespült. Alle metall- oder kunststoffhaltigen Mehrwegteile wurden ausreichend mit Methanol und bidest. Wasser im Ultraschallbad gereinigt.

Das Pflanzenmaterial, der Boden und die Gülle wurden mittels HPLC-MS/MS analysiert.

## **B.5. Herstellung der Stamm- und Standardlösungen**

AMO, AMA, Diketo, ENR, CIP, TC, epi-TC, CEF wurden als kommerzielle Produkte erworben. Die Stammlösungen (1.0 g/L) wurden in ACN für ENR, in ACN/bidest. Wasser (1:1, v/v) für TC, Epi-TC und CEF und in bidest. Wasser für AMO, AMA und Diketo gelöst. Die Stammlösung für CIP wurde in saurer ACN-Lösung (Ameisensäure 2% v/v) hergestellt.

Desfuroylceftiofur (DFC) und Desfuroylceftiofur (DCA), beides Umwandlungsprodukte in

der Ceftiofuranalytik sind kommerziell nicht erhältlich, somit mussten sie im Labor hergestellt werden. Für die Herstellung von DFC wurden 500 µL der CEF-Stammlösung mit 5 mL Boratpuffer (pH9, KOH<sub>s</sub>) und 0,02 g Dithioerythritol (DTE) versetzt und für 30 min bei 50 °C inkubiert. Die Umwandlung zu DFC wurde massenspektrometrisch überprüft. Von der DFC-Lösung wurden 1 mL abgenommen, mit 0,02 g Iodacetamid (IAA) versetzt und erneut für 30 min bei 50 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Auch hier wurde die Umwandlung zu DCA massenspektrometrisch überprüft.

Aus den Antibiotikastammlösungen wurden durch Verdünnung mit Fließmittel A Multistandardlösungen. Standardlösungen wurden jeden Tag frisch angesetzt. Die Stammlösungen waren bei -30 °C für 6 Monate stabil.

## B.6. Analyse der Pflanzen 2011

Die Vorgehensweise für die Rückstandsanalytik von Antibiotika in Pflanzen ist in Abbildung 48 als Ablaufschema dargestellt. Nach der Homogenisation des Pflanzenmaterials folgte eine Fest-Flüssigextraktion. An diese schloss sich eine Festphasenextraktion an. Zur Detektion der Antibiotika im SPE-Eluat wurde die LC-MS/MS-Technik eingesetzt.

Gemüsepflanzen (Weißkohlpflanzen und Porreepflanzen des Feldversuches)
Zerkleinern, <u>Homogenisieren</u> und Einwiegen <ul style="list-style-type: none"> <li>• Weißkohl (getrennt in Wurzel, Blätter und Kopf (je 2x 5 g))</li> <li>• Porree (getrennt in Wurzel, Blätter/Blattabschnitte jung und alt (je 2x 5 g))</li> </ul>
<u>Extraktion</u> mit 30 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer (pH 2) für 2x 10 min im Ultraschallbad
<u>Festphasenextraktion</u> : Aufkonzentrieren und Entfernen von Matrixbestandteilen
Konditionierung der Oasis HLB Bond-Kartusche (3 cc, 100 mg) mit <ul style="list-style-type: none"> <li>♦ 3 mL Acetonitril</li> <li>♦ 3 mL bidest. H<sub>2</sub>O</li> <li>♦ 3 mL 2% Trichloressigsäure (w/v)</li> </ul>
Probenaufgabe
Waschen mit <ul style="list-style-type: none"> <li>♦ 2 mL bidest. H<sub>2</sub>O</li> <li>♦ 2 mL 2% Trichloressigsäure (w/v)</li> </ul>
Elution mit 2x 2.5 mL Acetonitril (ie 2 Eluate vereinen)
Einengen des Eluates bis zur Trockne
Aufnahme des Rückstandes in 250 µL Fließmittel A*: fertige Messprobe * Fließmittel A: bidest. H <sub>2</sub> O / Acetonitril / Ameisensäure (90/10/0,1 (v/v/v))
<u>Identifizierung und Quantifizierung mittels LC-MS</u>

**Abbildung 48: Schema der Probenaufbereitung zur Untersuchung von Antibiotika in Pflanzen**

### *B.6.1. Extraktion und Aufreinigung*

Die klein geschnittenen und bei -60 °C gelagerten Pflanzenteile wurden in einer Messermühle (Grindomix GM200, Retsch) homogenisiert. Für die anschließende Fest-Flüssig-Extraktion wurden 2x5 g Pflanzenmaterial eingesetzt und parallel aufgearbeitet

### *B.6.2. Fest-Flüssigextraktion*

Die Fest-Flüssig-Extraktion bestand aus zwei Extraktionsstufen mit folgendem Puffer:

#### *KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer*

Eine 0,01 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung wurde hergestellt und mittels 20%-iger (w/w) Trichloressigsäure (TCA) auf pH 2 für den KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Extraktanten eingestellt.

#### *Extraktionsstufe 1*

Das Pflanzenhomogenat wurde mit 20 mL Extraktionslösung versetzt und im Ultraschallbad für 10 min behandelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 2325 x g für 10 min. Der Überstand wurde in ein frisches Zentrifugenglas überführt.

#### *Extraktionsstufe 2*

Das verbleibende Sediment wurde in 10 mL Extraktionslösung aufgeschlämmt, 10 min im Ultraschallbad inkubiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde mit dem Überstand aus Extraktionsstufe 1 vereint. Die vereinigten Überstände wurden für die sich anschließende SPE verwendet.

### *B.6.3. Festphasenextraktion (SPE)*

Die Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) erfolgte mithilfe des sog. OPI-Systems (*over pressure inline*, Fa. R. Sauerbrey, [17, 248]). Dieses Gerät ermöglicht einen kontinuierlichen Fluss des Extraktes durch die Kartusche.



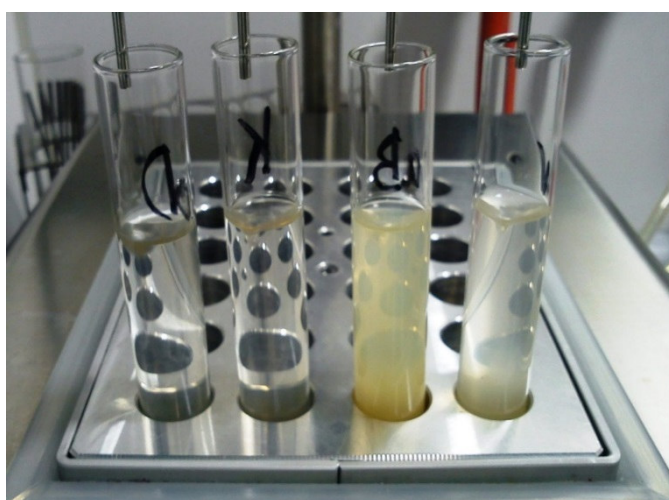


**Abbildung 49: OPI-SPE-System bestehend aus Kompressor, Pumpe, Spritzen, Kartuschen und Auffanggefäße**

Durch einen Kompressor und eine Pumpe wurde ein hydraulisches System betrieben

Zur Konditionierung der HLB-Bond-Kartusche (3cc) wurden nacheinander 3 mL ACN, 3 mL bidest. Wasser und 3 mL 2% (w/v) TCA aufgetragen. Nach der Extraktaufgabe wird mit 2 mL 2% (w/v) TCA und 2 mL bidest. Wasser gewaschen. Die Effluat wurden verworfen. Die Kartusche wurde trockengesaugt und anschließend erfolgte die Extraktion mit 5 mL ACN. Es wurden jeweils zwei Eluate derselben Probe vereint.

Die Eluate der SPE wurden unter Stickstoffstrom in einem Metallheizblock bei 30 °C bis zur Trockne eingengt (siehe Abbildung 50). Die eingengten Eluate wurden in 250 µL Fließmittel A aufgenommen, gegebenenfalls (starke Trübung) für 10 min bei 2325 x g zentrifugiert und für die LC-MS verwendet.



a)



b)

**Abbildung 50: a) Metallblockthermostat mit einzuengenden Eluaten von Pflanzen, b) Zur Trockne eingengtes Eluat**

#### B.6.4. LC-MS/MS-System

Als HPLC-Anlage wurde ein System von Thermo-Finnigan, bestehend aus einem SCM 1000 Vakuum Membrane Degaser, einer HPLC-Gradientenpumpe SpectraSYSTEM P 4000, einem Injektionssystem AS 3000 Autosampler mit integrierter Probenkühlung (10 °C), Säulenofen (30 °C) und STUW-Trapping Säulenschaltventil genutzt. Für die Massenspektrometrie stand eine LCQ Advantage von Thermo Fisher Scientific zur Verfügung. Der Massenanalysator ist bei der LCQ eine dreidimensionale Ionenfalle. Die Ionisierung erfolgte durch Elektrospray-Ionisation (ESI) im positiv-Modus  $[M+H]^+$ . Zur Identifizierung der Analyten wurden der SRM (single reaction mode) für Vorläufer-(Precursor-) und Produkt-Ion aus den MS/MS-Stoßexperimenten (He) eingesetzt.

##### Chromatographische Bedingungen:

Fließmittel: A: ACN/Wasser/Ameisensäure (10/90/0,1 % v/v)

B: ACN/Wasser/Ameisensäure (60/40/0,1 % v/v)

Flussrate: 0,4 mL/min

Vorsäule: YMC-Pack ODS-AM, VS, innen: 3 mm x 10 mm, Partikelgröße 5µm Porengröße 12 nm

Trennsäule: YMC-Pack ODS-AM, innen: 3 mm x 150 mm, Partikelgröße 5µm, Porengröße 12 nm

Säulenofen: 30 °C

Autosampler: 4 °C

Injektionsvolumen: 20 µL bzw. 100 µL

Gradient: siehe Tabelle 40

**Tabelle 40: Lösungsmittelgradient für die HPLC**

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0-1,5	90	10
1,5-10	80-60	20-40
10-17	60-0	40-100
17-21	0	100
21-24	0-90	100-10
24-35	90	10



### Detektion:

#### *Tune –Page-Parameter:*

#### *für Amoxicillin und Penicilloinsäure von Amoxicillin:*

Capillary Voltage:	4 [V]
Cone Mass Range:	80-2000 [m/z]
Sheath Gas Flow Rate:	45 [arb]
Auxiliary Gas Flow Rate:	0 [arb]
Ion Spray Voltage:	5 [kV]
Capillary Temperature:	250 [°C]
Tube Lens Offset:	0 [V]
Multipole 1 Offset:	-2,25 [V]
Lens Voltage:	-16 [V]
Multipole 2 Offset:	-5,5 [V]

#### *für Diketopiperazin des Amoxicillins, Ciprofloxacin, Enrofloxacin, epi-Tetracyclin, Tetracyclin:*

Capillary Voltage:	9 [V]
Cone Mass Range:	80-2000 [m/z]
Sheath Gas Flow Rate:	45 [arb]
Auxiliary Gas Flow Rate:	0 [arb]
Ion Spray Voltage:	5 [kV]
Capillary Temperature:	250 [°C]
Tube Lens Offset:	- 5,0 [V]
Multipole 1 Offset:	- 2,5 [V]
Lens Voltage:	- 16 [V]
Multipole 2 Offset:	- 5,5 [V]

### Auswertung: Xcalibur 2.0

Die typischen Fragmente der einzelnen Antibiotika sind in Tabelle 41 aufgelistet. Die zu messenden Quasimolekül-Ionen wurden nacheinander in der Ionenfalle isoliert und mit Helium als Stoßgas fragmentiert, die dazu nötige Stoßenergie ist ebenfalls in Tabelle 41 aufgeführt. Die Identifizierung der Analyten erfolgte über die Massenspuren der Quasimolekül-Ionen und Fragment-Ionen (MS/MS-Stoßexperimente (He), MS1, MS2), ihre relativen Intensitäten und Retentionszeiten (Ionisierungsmethode: Elektrospray Ionisation (ESI), Positiv-Modus). Zur Quantifizierung wurde die Summe der MS<sup>2</sup>-Signalintensitäten korrespondierender Produkt-Ionen verwendet.

Das beschriebene Gesamtsystem wurde anhand von Antibiotikastandardlösungen jeweils vor und nach der Messung überprüft.

**Tabelle 41: Strukturen und MS/MS-Daten der eingesetzten Antibiotika und deren Umwandlungsprodukte**

Stoff-klasse	Bezeichnung	Abkürzung	Struktur	Vorläuferion (m/z)	Stoßenergie (%)	Produkt-Ionen (m/z) Peakintensitäten	Retentionszeit [min]
Fluorchinolone	Enrofloxacin	ENR		360,2	40	245,1 (< 5%) 316,2 (100%) 317,0 (10-20%) 342 (< 5%)	8,5
	Ciprofloxacin	CIP		332,0	39	288,1 (100%) 314,1 (< 5%)	7,5
β-Lactame	Amoxicillin	AMO		365,8	35	207,0 (5%) 348,8 (100%)	3,1
	Penicilloinsäure von AMOn	AMA		384,0	35	366,9 (100%) 340,0 (10-20%) 323,0 (50-70%)	2,8
	Diketopiperazin	Diketo		365,8	35	159,9 (100%) 207,0 (10%)	7,0
Tetracycline	Tetracyclin	TC		445,0	35	410,0 (30%) 426,9 (100%) 427,9 (10%)	7,9
	epi-Tetracyclin	e-TC		445,0	34	410,0 (40-50%) 426,9 (100%) 427,9 (30%)	6,6

### B.6.5. Validierung

#### Wiederfindung

Ob die gewählte Methode zur Rückstandsanalytischen Bestimmung für den zu untersuchenden Antibiotikagehalt und der vorliegenden Matrix geeignet war, wurde mittels Wiederfindungsstudien überprüft. Dazu wurde eine definierte Menge des „Rückstands“ zur Matrix

einer Probe der Kontrollparzelle (Blindprobe) gegeben. Die dotierte Blindprobe wird mit der zu testenden Methode aufgearbeitet und die gemessene „Rückstandsmenge“ in Prozent der Ausgangsmenge/der dotierten Menge angegeben. Hierzu steht in einer Verfahrensanweisung vom Landeslabor Berlin-Brandenburg: „Die Wiederfindung für die Rückstandsanalytik sollte in der Regel zwischen 70 und 120% liegen. Wird auf Grund von bekannten Stoffeigenschaften eine reproduzierbar geringere Wiederfindung beobachtet, kann für den Fall, dass keine andere geeignete Methode existiert, auch eine Wiederfindung von mindestens 40 % akzeptiert werden.“ Weiterhin ist vermerkt, dass die Wiederfindung eine konzentrationsabhängige Größe ist [305]. Auch IUPAC [306] und Sanco [307] sprechen von einer anzustrebenden Wiederfindung zwischen 70 und 120%, weisen aber auch darauf hin, dass abhängig von der Methode auch eine geringere Wiederfindung akzeptabel ist, besonders wenn es sich um sehr geringe Konzentrationen handelt (siehe Tabelle 42). Dem Analytiker muss in diesen Fällen bewusst sein, dass die gemessenen Werte möglicherweise vom wahren Wert abweichen, somit eine relativ geringe Genauigkeit aufweisen. Abhängig von der zu erwartenden Konzentration sind Abweichungen von -50 bis +20% akzeptabel (siehe Tabelle 43).

**Tabelle 42: Maximale akzeptable Wiederfindung quantitativer Methoden nach DIN CEN/TS 15356**

Richtlinien zu Leistungs- und Validierungskriterien von analytischen Methoden, erweitert für niedrige Gehalte (308)

Konzentration	Durchschnittliche Wiederfindung in %
≤ 10 ppb	40 - 120
100 – 10 ppb	60 - 110
≥ 100 ppb	80 - 110

**Tabelle 43: Maximale akzeptable Abweichung quantitativer Methoden nach 2002/657/EC. (308)**

Konzentration	Abweichung in %
≤ 1 ppb	-50 - +20
1 – 10 ppb	-30 - +10
≥ 10 ppb	-20 - +10

Parallel zur Durchführung des Feldversuchs, wurden die im Arbeitskreis bestehenden Methoden getestet und gegebenenfalls weiterentwickelt:

Für die Rückstandsanalytik von Amoxicillin und seinen bekanntesten Hauptumwandlungsprodukten Penicilloinsäure und Diketopiperazin von Amoxicillin (AMA und Diketo) in den

Pflanzenproben wurde die Methode adaptiert, die von Chowdhury [240] beschrieben wurde. Diese Methode wurde auch für die Antibiotika Enrofloxacin und Tetracyclin und ihre Umwandlungsprodukte angewandt.

**Tabelle 44: Wiederfindung von Antibiotika und Umwandlungsprodukten im Weißkohlkopf**

Dotierung von Kontrollproben, Ernte 2012, Weißkohlkopf,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Extraktant, Matrixkalibrierung, N=2, n=6, n.n.=nicht nachgewiesen, BG=Bestimmungsgrenze

<div>Dotierung [µg/kg FG]</div> <div>Analyt</div>	Wiederfindung [%]						
	2	4	8	10	20	40	50
ENR	124,4 +/- 6,7	52,8 +/- 3,1	30,7 +/- 7,6	41,3 +/- 3,5	35,2 +/- 1,7	28,3 +/- 2,4	39,7 +/- 5,6
CIP	86,9 +/- 13,2	32,9 +/- 1,0	26,8 +/- 14,9	36,2 +/- 6,2	42,8 +/- 1,4	34,5 +/- 3,9	56,3 +/- 6,0
AMO	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	28,9 +/- 11,1
AMA	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	<BG
Diketo	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	<BG
e-TC + TC	114.4 +/- 14.9	49.8 +/- 2.9	22.8 +/- 4.5	27.7 +/- 4.1	16.2 +/- 1.2	17.8 +/- 1.4	48.9 +/- 7.4

**Tabelle 45: Wiederfindung Antibiotika und Umwandlungsprodukte in Porree**

Dotierung von Kontrollproben, Ernte 2012, junge Blattabschnitte, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Extraktant, , Matrixkalibrierung, N=2, n=6, n.n.=nicht nachgewiesen, BG=Bestimmungsgrenze

<div>Dotierung [µg/kg FG]</div> <div>Analyt</div>	Wiederfindung [%]						
	2	4	8	10	20	40	50
<b>ENR</b>	76,2 +/- 20,5	123,7 +/- 24,2	121,7 +/- 39,0	107,8 +/- 24,0	136,5 +/- 17,3	133,6 +/- 19,2	154,7 +/- 39,3
<b>CIP</b>	n.n.	57,2 +/- 26,2	40,0 +/- 15,1	69,6 +/- 11,1	47,8 +/- 18,7	40,3 +/- 7,3	106,6 +/- 19,1
<b>AMO</b>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	<BG	<BG
<b>AMA</b>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	<BG	<BG
<b>Diketo</b>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	<BG
<b>e-TC + TC</b>	n.n.	82,4 +/- 12,4	66,7 +/- 11,1	93,6 +/- 26,1	67,4 +/- 7,8	60,6 +/- 4,3	97,8 +/- 11,8

Es wurde auch die Methode von Yolcu *et al.* 2009 [17] und eine Probenzerkleinerung mit Hilfe des Gentle-Macs (Miltenyi Biotec), ein Gerät zur Homogenisierung von menschlichen Gewebezellen, getestet. Beides führte nicht zu einer Erhöhung der Wiederfindung. Auch ein Austesten der HPLC-Bedingungen für Amoxicillin und seiner Umwandlungsprodukte führte nicht zu einer Besserung der Wiederfindung. Für Boden wurde die Methode mit einem Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Extraktanten von Chowdhury *et al.* (2015) [21] verwendet.

#### Sicherung der Identifizierung, Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze

Die Bestätigung der positiven Signale beruhte auf drei SRM-Signalen (1 Vorläufer-Ion und 2 Produkt-Ionen), die für die untersuchten Antibiotika in Tabelle 41 aufgeführt sind. Gemäß den im Entwurf des SANCO/1085/2000 und der Entscheidung beschriebenen Anforderungen 2002/657/EG in Verbindung mit der Richtlinie 96/23/EG. (Siehe auch: Entscheidung der Kommission 93/257/EWG und 93/256/EWG, Kaufmann et al. 2015) mussten weiterhin die relativen Intensitätsverhältnisse der beiden Massenübergänge für einen positiven Befund übereinstimmen. Die Bestätigung der Arzneimittelrückstände (ENR und Tetracycline) in Gemüse und Weizen mittels hochauflösender-Massenspektrometrie wurde in einer früheren Studie gezeigt [13, 248].

Die der Identifizierung folgenden Quantifizierung basierte auf den summierten Signalintensitäten der entsprechenden Übergänge, dargestellt im TIC (*total ion chromatogram*). Das

Verhältnis von Analyt-Peakfläche gegen Analyt-Konzentration im Standard wurde verwendet um Kalibriergeraden zu zeichnen (Abbildung 51, S.175). Die Matrix-Kalibrierung der Analyten zeigte für ENR und TC bis 50 µg/kg FG (Frischgewicht, FG) Linearität, für AMO bis 125 µg/kg FG und DCA bis 200 µg/kg FG Linearität. Für alle Analyten wies die lineare Kalibrierfunktionen ein Bestimmtheitsmaß von höher als 0,93 auf. Als Kriterium für die Messgenauigkeit des Analyseverfahrens wurden die relativen Standardabweichungen für die Bestimmung von Antibiotika aus dem dotierten Pflanzenhomogenat (2, 4, 8, 10, 20, 40, 50 µg/kg FG, sechs Wiederholungen, Matrixkalibrierung) bestimmt. Die erhaltenen Standardabweichungen für die Dotierung 2 µg/kg FG zwischen 7 und 21% sind im Einklang mit der Entscheidung der Kommission 2002/657/EG (Tabelle 43). Der Parameter Selektivität wurde durch Vergleich der Retentionszeiten und Produkt-Ionenintensitäten der Analyten in der externen Standardlösung und in Extrakten vom dotierten Pflanzenhomogenat ermittelt. Der Retentionszeiten unterschieden sich außer für AMO voneinander nicht mehr als 5,1%. Des Weiteren wurde die Höchsttoleranz der relativen Intensitäten für die Produkt-Ionenintensitäten nicht überschritten. Somit sind die Anforderungen der Entscheidung der Kommission 2002/657 / EG erfüllt. Die Nachweisgrenzen (NWG) wurden entsprechend des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses ( $S/N = 3:1$ ) geschätzt, ebenso die Bestimmungsgrenze mit  $S/N = 10:1$  (siehe Tabelle 46 und Tabelle 47).

**Tabelle 46: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (µg/kg FG) in Weißkohl**

Wiederfindungsexperimente, Dotierung von Kontrollproben, Ernte 2012, Weißkohlkopf,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Extraktant,  $N=2$ ,  $n=6$ , NWG = Nachweisgrenze; BG = Bestimmungsgrenze

Analyt	NWG $S/N$ 3:1	BG $S/N$ 10:1
ENR	0,2	0,3
CIP	0,3	0,4
AMO	30	50
AMA	40	100
Diketo	50	75
e-TC + TC	0,4	0,7

**Tabelle 47: Nachweis- und Bestimmungsgrenze n(µg/kg FG) in Porree**

Wiederfindungsexperimente, Dotierung von Kontrollproben, Ernte 2012, junge Blattabschnitte,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Extraktant,  $N=2$ ,  $n=6$ ; NWG = Nachweisgrenze; BG = Bestimmungsgrenze

Analyt	NWG $S/N$ 3:1	BG $S/N$ 10:1
ENR	0,1	0,2
CIP	0,4	4
AMO	75	200
AMA	65	100
Diketo	50	100
e-TC + TC	1	2

### Kalibrierkurven für externe und Matrixkalibrierung

Die Kalibrierkurven für externe und Matrixkalibrierung sind in Abbildung 51 und Abbildung 52 gezeigt. Für die externe Kalibrierung wurden Multistandards in verschiedenen Konzentrationen gemessen. Für die Matrixkalibrierung wurden Kontrollproben von Porree und Weißkohl mit der jeweiligen Methode aufgearbeitet und das SPE-Eluat zur Messung mit Multistandardlösung aufgenommen.

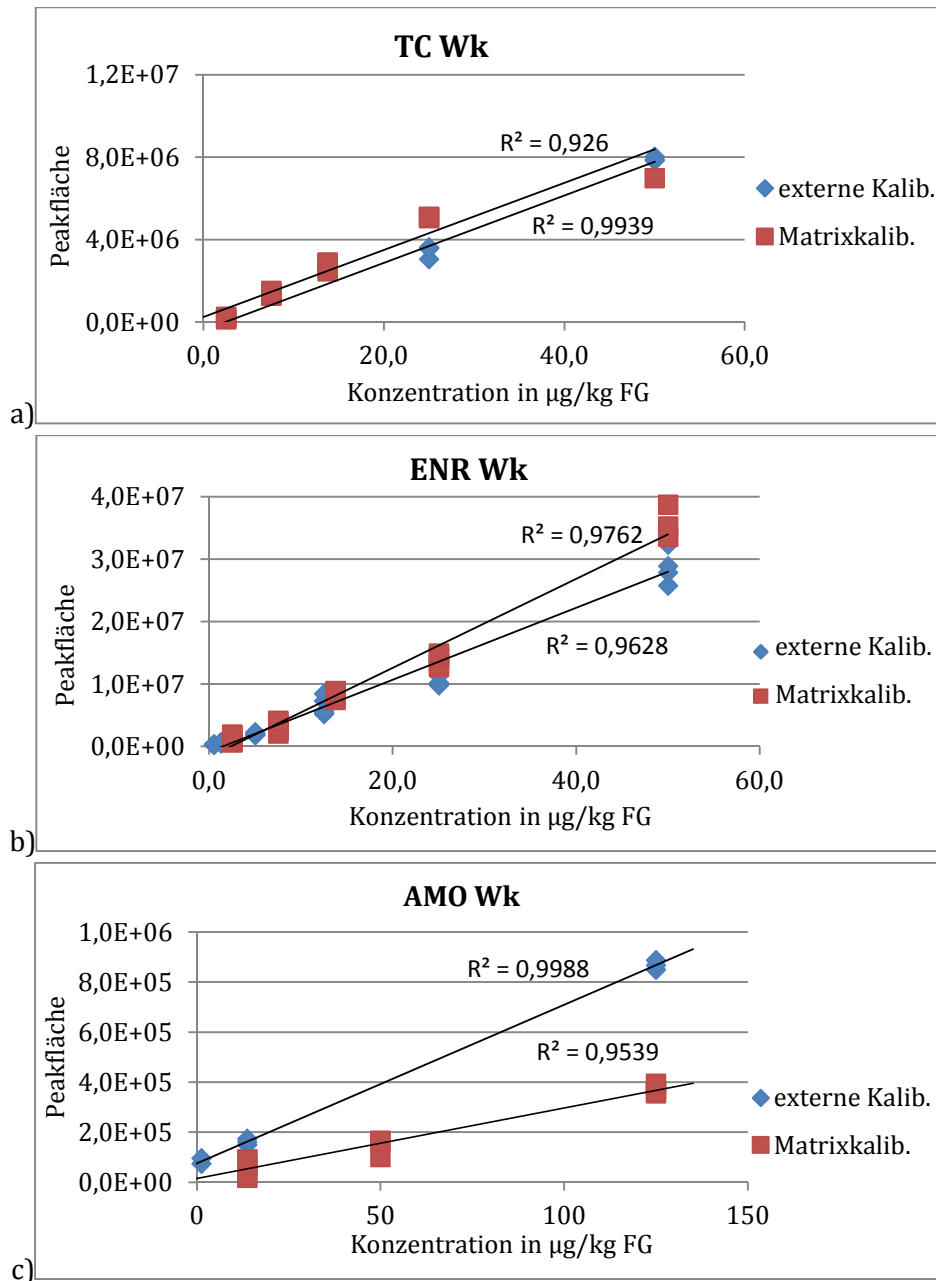
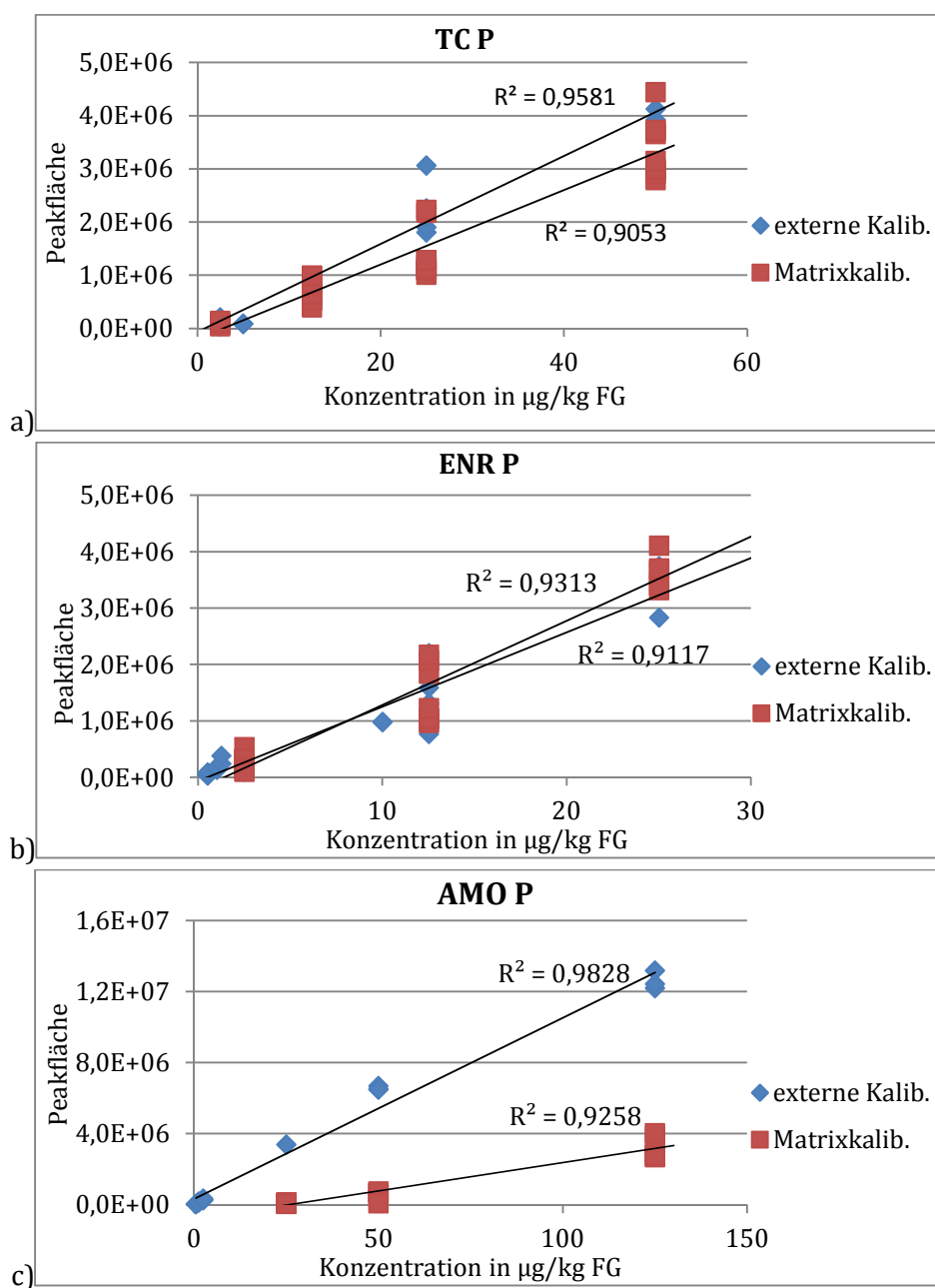


Abbildung 51: Vergleich der externen und Matrix-Kalibrierkurve für die Antibiotika  
a) TC, b) ENR, c) AMO



**Abbildung 52: Vergleich der externen und Matrix-Kalibrierkurve für die Antibiotika**  
**a) TC, b) ENR, c) AMO**

Die Kalibrierkurven für TC und ENR hatten für die Matrices Porree und Weißkohl annähernd gleiche Verläufe wie die der externen Kalibrierkurve. Eine Quantifizierung von Rückständen ist für diese Antibiotika somit mit externer Kalibrierung möglich. Dies zeigten bereits auch Schwake-Anduschus und Stevens in ihren Dissertationen [196, 309].



Die Kalibrierkurven für AMO mit der Matrix Porree oder Weißkohl wichen von der externen Kalibrierkurve ab. Eine Quantifizierung möglicher Befunde sollte hier mittels Matrixkalibrierung erfolgen.

#### **B.7. Analyse der Pflanzen 2012**

Die Durchführung der Probenvorbereitung (siehe auch Abbildung 48) wurde in 2012 wie folgt geändert:

##### *Fest-Flüssig-Extraktion*

Neben dem  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer wurde ein weiterer Extraktionspuffer verwendet:

##### *Borat-Puffer (0,1 mol/L, pH 9)*

Es wurden 25 g Borsäure ( $\text{H}_3\text{BO}_3$  wasserfrei) in einem 1000 mL Messkolben eingewogen, mit KOH auf pH 9 eingestellt und mit bidest. Wasser bis zur Kalibriermarke aufgefüllt.

Für die Extraktion von Cefotiofur wurde die Derivatisierung von Cefotiofur zu Desfuoyl cefotiofuracetamid mit der Extraktion desselben aus den Pflanzenmaterialien kombiniert [265, 266]. Als Extraktionsmittel wurde ein Boratpuffer verwendet, der mit Kaliumhydroxid (s) auf pH 9 eingestellt wurde.

Die 1. Extraktion erfolgte 2012 zunächst mit Acetonitril und nach kurzer Einwirkzeit wurde 10 ml Puffer zum Pflanzenhomogenat-Acetonitril-Gemisch gegeben und die 2. Extraktion mit 20 ml Puffer angeschlossen.

Für die extraktive Derivatisierung von CEF wurden dem Extraktionsansatz 0,02 g DTE zugegeben und für 30 min bei 50°C im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurden 0,05 IAA hinzugeben und für 30 min bei 50°C inkubiert. Um einer Verstopfung der Kartusche vorzubeugen, wurde die Pflanzen-Extrakt-Lösung zur Proteinfällung mit 500 µL Ameisensäure (FA) angesäuert (pH 3). Im Anschluss wurde für 10 min bei 2325x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment erneut, wie oben beschrieben, extrahiert.

### Festphasenextraktion

#### *Konditionierung*

Die Konditionierung der SPE-Kartusche erfolgte mit ACN und anschließend mit bidest. Wasser. Für die C18-Kartusche wurden jeweils 3 mL und für die HLB-Bond-Kartusche aus 2011 jeweils 5 mL verwendet.

#### *Extraktaufgabe und Waschen*

Nach der Extraktaufgabe erfolgten die Waschschrirte mit 5% ACN und bidest. Wasser. Für die C18-Kartusche wurden jeweils 3 mL und für die HLB-Bond-Kartusche jeweils 5 mL verwendet. Die Effluare wurden verworfen.

#### *Elution*

Die Elution erfolgte wie 2011 mit 5 mL ACN.

**Tabelle 48: Verwendete Pufferlösungen und SPE-Kartuschen für die Analyse von Pflanzenkompartimenten aus der Ernte2012**

Probe			Extraktionsmittel	Kartusche
Porree	ENR	BJ	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	C18 3cc 200 mg
		BA		
		W	ACN + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	HLB 6cc 200 mg
	AMO	BJ	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	HLB 6cc 200 mg
		BA		
		W		
	CEF	BJ	Boratpuffer + DFC + IAA	C18 3cc 200 mg
		BA		
		W		
	oD	BJ	Boratpuffer + DFC + IAA	C18 3cc 200 mg
		BA	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	HLB 6cc 200 mg
		W	ACN + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	HLB 6cc 200 mg
Weißkohl	ENR	BJ	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	C18 3cc 200 mg
		BA		
		W	ACN + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	HLB 6cc 200 mg
	AMO	BJ	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	HLB 6cc 200 mg
		BA		
		W	ACN + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	HLB 6cc 200 mg
	CEF	BJ	Boratpuffer + DFC + IAA	C18 3cc 200 mg
		BA		
		W		
	oD	BJ	Boratpuffer + DFC + IAA	HLB 6cc 200 mg
		BA	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
		W	ACN + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	

Für die massenspektrometrische Messung von CEF wurden folgende Parameter eingestellt:

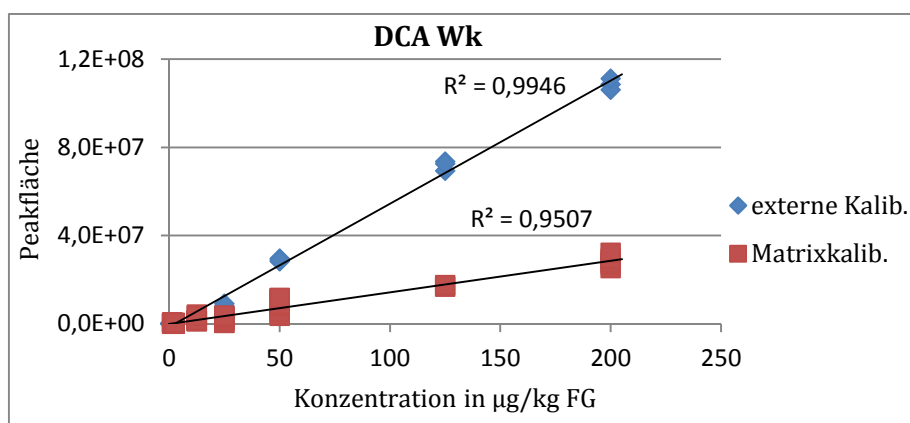
Detektion:

*Tune –Page-Parameter für Cefotiofur:*

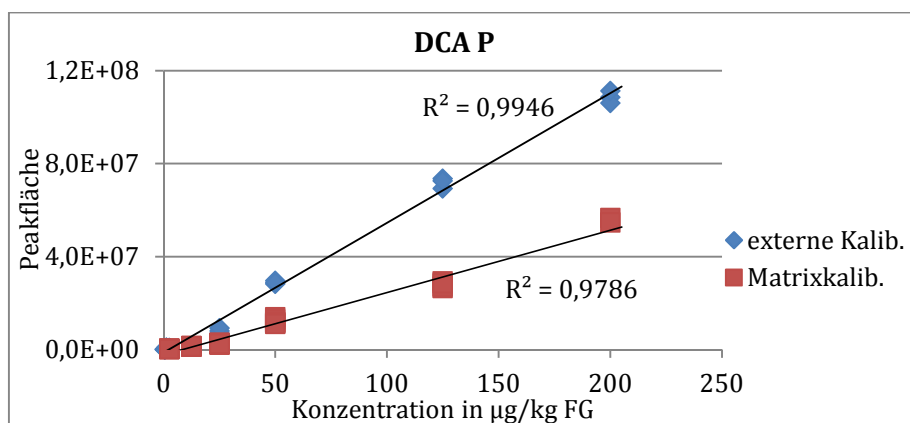
Capillary Voltage:	21 [V]
Cone Mass Range:	80-2000 [m/z]
Sheath Gas Flow Rate:	45 [arb]
Auxiliary Gas Flow Rate:	0 [arb]
Ion Spray Voltage:	5 [kV]
Capillary Temperature:	250 [°C]
Tube Lens Offset:	5,0 [V]
Multipole 1 Offset:	- 2,5 [V]
Lens Voltage:	- 16 [V]
Multipole 2 Offset:	- 5,5 [V]

**Kalibrierkurven für externe und Matrixkalibrierung CEF Analytik**

Der Vergleich der Kalibrierkurven der externen gegen die Matrixkalibrierung zeigt einen deutlichen Matrixeinfluss bei der Konzentrationsmessung der DCA-Wiederfindungen sowohl in Weißkohl als auch in Porree, siehe Abbildung 51 und Abbildung 54.



**Abbildung 53: Vergleich der externen und Matrix-Kalibrierkurve für DCA, dem derivatisierten CEF, und der Matrix Weißkohl**



**Abbildung 54: Vergleich der externen und Matrix-Kalibrierkurve für DCA, dem derivatisierten CEF und der Matrix Porree**

## **B.8. Analyse der Tierexkremente**

Schweinegülle wurde 1:10 (v/v) und Hühnerkot 1:5 (w/v) verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 0,5 mL wie bei den Pflanzen in 2011 extrahiert und aufgereinigt. Im Unterschied zur Pflanze wurde statt der Oasis-HLB-Kartusche die 3cc-200 mg-C18-Kartuschen von Agilent verwendet. Es wurde jeweils nur ein Eluat für die HPLC\_MS/MS Analytik verwendet

## **B.9. Analyse des Bodens**

### Fest-/Flüssigextraktion

Für die Extraktion der Antibiotika wurden 5 g lufttrockener Boden mit 10 mL Extraktionslösung ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ -Puffer, pH 8,5) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (Rotofix 32, Hettich) bei 2325 x g für 10 min. Der Überstand (Überstand I) wurde abgenommen, das Bodensediment erneut in 10 mL Extraktionslösung aufgeschlämmt, 30 min geschüttelt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Der erhaltene Überstand II wurde mit Überstand I vereint. Die vereinigten Überstände wurden mit HCl p.a. auf den gewünschten pH 3 für die anschließende Festphasenextraktion eingestellt.

### $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ -Puffer

400 g  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  wurden in einen 1000 mL Messkolben eingewogen und in 700 mL bidest. Wasser gelöst. Im Anschluss wurden 20 mL konzentrierte Ammoniaklösung (25% w/w) zugesetzt. Der pH-Wert des  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ -Extraktanten wurde mit 25%iger (w/v) HCl auf pH 8,5 eingestellt und mit bidest. Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

### Festphasenextraktion

Die HLB-Bond-Kartusche (6cc) wurde mit 3 mL Methanol und 3 mL bidest. Wasser konditioniert. Nach der Extraktaufgabe wurde mit 6 mL 5% (v/v) Methanol gewaschen. Die Kartusche wurde trocken gesaugt, gefolgt von der Extraktion mit 3 mL Methanol.

Die weitere Vorgehensweise entsprach der der Tierexkremente.

## Wiederfindung Boden

Die eher geringen Wiederfindungen (Tabelle 49) bei der  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ -Analysemethode für Antibiotika aus Boden sind möglicherweise durch eine hohe Sorption begründet.

**Tabelle 49: Wiederfindung Antibiotika und Umwandlungsprodukte in Boden**

Dotierung von Kontrollproben, Bodenfraktion < 0,5 mm,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ -Extraktant, externe Kalibrierung, N=2, n=6

Dotierung [µg/kg FG] Analyt	Wiederfindung [%]					
	10	20	50	100	200	2.000
ENR	n.n.	30,5 +/- 2,1	39,3 +/- 2,0	41,5 +/- 8,2	43,7 +/- 15,9	43,6 +/- 14,5
CIP	n.n.	14,7 +/- 9,5	17,9 +/- 8,9	39,2 +/- 8,3	41,7 +/- 2,1	48,7 +/- 6,2
AMO	n.n.	n.n.	20,7 +/- 4,0	23,7 +/- 4,6	16,3 +/- 8,9	25,6 +/- 3,8
AMA	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,2 +/- 0,9
Diketo	n.n.	n.n.	< BG	27,5 +/- 13,1	30,0 +/- 9,6	42,6 +/- 4,5
e-TC + TC	9,6 +/- 2,9	9,9 +/- 4,1	29,6 +/- 9,6	35,8 +/- 10,9	36,8 +/- 15,3	34,3 +/- 2,5

## Nachweis- und Bestimmungsgrenze Boden

Die Extraktion der Antibiotika aus Boden mittels des  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ -Puffers wurde für die Extraktion von ENR optimiert. Dies zeigt sich in der vergleichsweise niedrigen NWG und BG, die für ENR gegenüber den anderen untersuchten Antibiotika erzielt werden konnte.

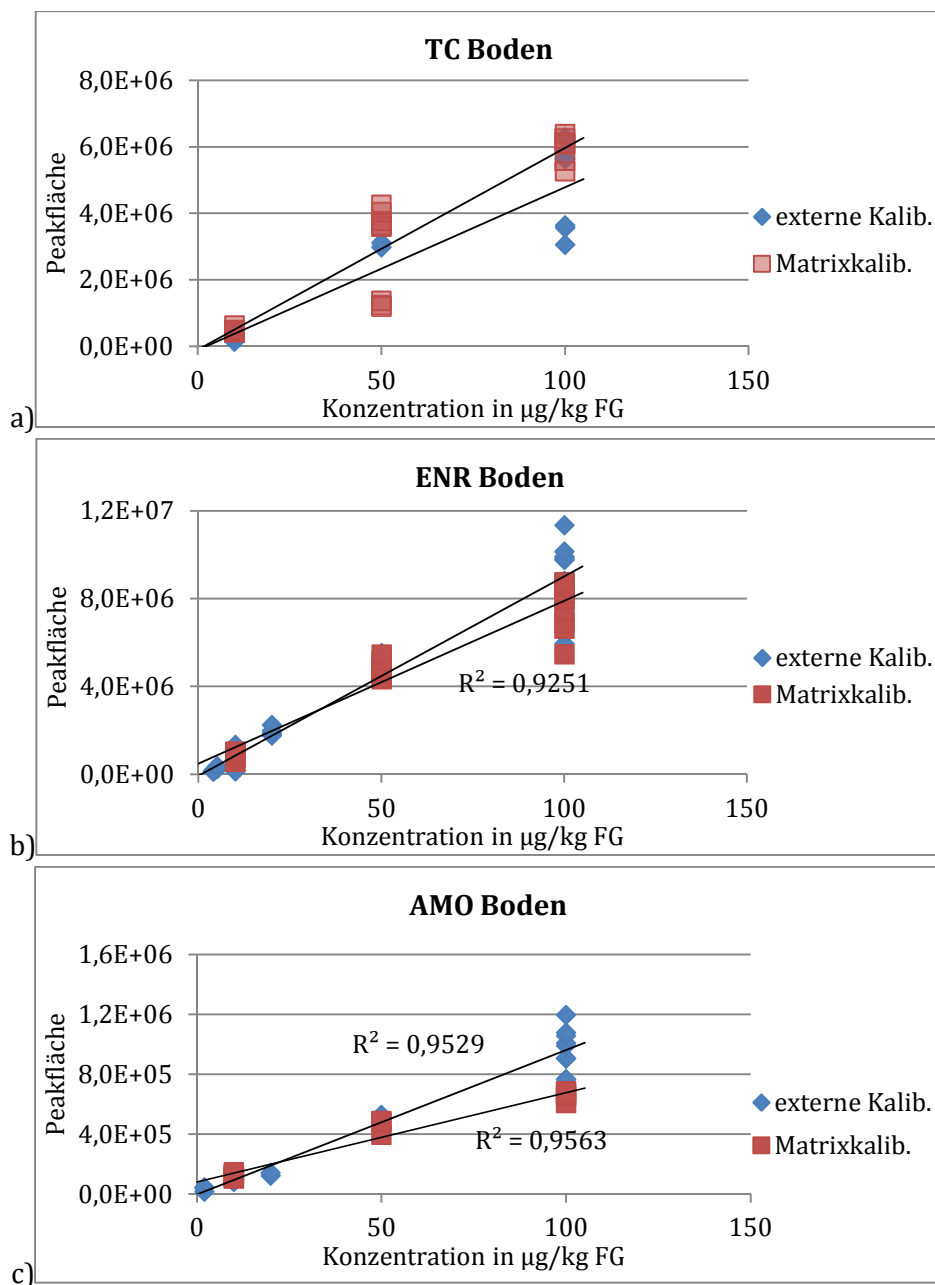
**Tabelle 50: Nachweis- und Bestimmungsgrenze (µg/kg FG) im Boden**

Wiederfindungsexperimente, Dotierung von Kontrollproben, Ernte 2012,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ -Extraktant, N=2, n=6, NWG=Nachweisgrenze, BG=Bestimmungsgrenze

Analyt	NWG S/N 3:1	BG S/N 10:1
ENR	1	5
CIP	10	20
AMO	25	50
AMA	300	1000
Diketo	25	75
e-TC + TC	10	25

### Kalibrierkurven für externe und Matrixkalibrierung Boden

Der Vergleich der externen mit der Matrixkalibrierung Boden zeigt, dass die extrahierbaren Bestandteile des Boden bei der Bestimmung der Antibiotikakonzentration kaum stören (Abbildung 55).



**Abbildung 55: Vergleich der externen und Matrix-Kalibrierkurve für die Matrix Boden und die Antibiotika a) TC, b) ENR, c) AMO.**

## C. Perl Skript für das „Spectral Counting“ \*

```
#!/usr/bin/perl
#Script to convert data from mass-spectrometer to csv

use strict;
use Math::Round;

my @files = glob("*.txt");
my $filter = 10000;
my $counter = 0;
my $sep = "\t";
my $nl = "\n";
my $fname;
my $outputfile = "peakmass.csv";
open(OFILE, ">$outputfile") || die "Failed to open output file $!\n";
print(OFILE "filename\tstart_time\tmass/position\tintensity\n");

foreach my $inputfile (@files) {
    print "Processing file $inputfile\n";

    $fname = $inputfile;
    $fname =~ s/(.*)\.txt/$1/;
    my $start_time;
    my $peakmass;
    my $peakintensity;
    my $line;

    open(STREAM,"<$inputfile") || die "Failed connecting to File: $!\n";
    while (<STREAM>) {
        $line = $_;
        if ($line =~ m/.*start_time = (\d+\.\d+).*/) {
            $start_time = nearest (0.1, $1);
        }
        if ($line =~ m/.*PeakIntensity = (\d+\.\d+).*PeakMass = (\d+\.\d+).*/) {
            $peakmass = nearest(1.0, $2);
            $peakintensity = $1;
            #print "$peakmass ; $peakintensity\n";
            if ($peakintensity >= $filter ) {
                print OFILE "$fname$sep$start_time$sep$peakmass$sep$peakintensity$nl";
                $counter++;
                if ($counter % 1000 == 0) {print "$counter fertig\n"}
            }
        }
    }

    print "Processed $counter.\n";
    close(STREAM);
}

close(OFILE);
print "Finished\n";
```

---

\* Das Skript wurde von Joachim Aurbacher, JLU Gießen geschrieben.