

Lehrstuhl für Tierhygiene  
Department für Tierwissenschaften

**Untersuchungen zum Nachweis und Vorkommen von Antibiotika  
und deren Metaboliten in Schweinegülle**

*Katrin Susanne Harms*

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät *Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt* der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines *Doktors der Agrarwissenschaften* genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. rer. nat., Dr. agr. habil., Dr. h.c. (Zonguldak Univ./Türkei)  
Harun Parlar

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil. Johann Bauer
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat., Dr. agr. habil. Heinrich H. D. Meyer

Die Dissertation wurde am 01.02.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät *Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt* am 11.05.2006 angenommen.

© 2006 by Lehrstuhl für Tierhygiene

Alle Rechte, auch die der Übersetzung und des Nachdrucks sowie jede Art der photomechanischen Wiedergabe oder der Übernahme auf Datenträger, auch auszugsweise, bleiben vorbehalten.

Selbstverlag im Eigenvertrieb:  
Technische Universität München  
Lehrstuhl für Tierhygiene  
Am Weihenstephaner Berg 3  
D-85350 Freising  
Telefax: +49 8161 / 71-4516

Herstellung: Herbert Hieronymus, Druck und Verlag, München

*Eine elektronische Version der Dissertation ist im Netz der Universitätsbibliothek der Technischen Universität München veröffentlicht und unter der Internetadresse <http://mediatum.ub.tum.de> zu finden.*

## Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>11</b>
<b>B</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>13</b>
1	Einsatz von Antibiotika in der Tierhaltung .....	13
2	Einflussfaktoren der Umweltbelastung durch Antibiotika .....	16
3	Eigenschaften relevanter Antibiotika .....	18
3.1	Tetrazykline .....	18
3.1.1	Chemische und physikalische Eigenschaften .....	18
3.1.2	Pharmakologische Parameter .....	21
3.2	Sulfonamide .....	23
3.2.1	Chemische und physikalische Eigenschaften .....	23
3.2.2	Pharmakologische Parameter .....	25
3.3	Weitere in der Schweinehaltung verwendete Antibiotika .....	27
3.3.1	Fenicole: Florfenicol .....	27
3.3.2	Fluorquinolone: Enrofloxacin .....	28
3.3.3	Pleuromutiline: Tiamulin .....	29
4	Vorkommen von Antibiotika in der Umwelt .....	30
4.1	Vorkommen in Gülle .....	30
4.2	Vorkommen in Böden .....	33
4.3	Vorkommen in der aquatischen Umwelt .....	34
4.4	Abbau von Antibiotika in Gülle und Böden .....	35
<b>C</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>39</b>
1	Material .....	39
1.1	Probenmaterial .....	39
1.1.1	Standardgüllen .....	39
1.1.2	Güllen des Rückstandsmonitorings .....	39
1.2	Gebrauchsmaterial .....	42
1.3	Verbrauchsmaterial .....	42
1.3.1	Chemikalien .....	43
1.3.2	Standardsubstanzen .....	43
1.3.3	Weitere Lösungen .....	44

2	Methoden.....	45
2.1	Trockensubstanzbestimmungen .....	45
2.2	Methodenentwicklung .....	45
2.2.1	Probenvorbereitung .....	47
2.2.2	Extraktion .....	47
2.2.3	Aufreinigungsverfahren.....	48
2.2.4	LC-MS Analysenoptimierung .....	49
2.3	Hauptversuche.....	50
2.3.1	Nachweisverfahren für Antibiotika in Gülle .....	50
2.3.2	Methodenvalidierung.....	53
2.4	Versuche zur Stabilität von Antibiotika (Lagerungsversuche) .....	53
2.4.1	Laborversuche .....	53
2.4.2	Lagerungsversuch mit dotierter und natürlich kontaminierter Gülle .....	53
2.5	Antibiotika-Monitoring in Güllen .....	53
<b>D</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>55</b>
1	Ergebnisse der Trockensubstanzbestimmung.....	55
2	Qualitativer Nachweis von Antibiotika mittels LC-MS .....	56
3	Methodenentwicklung.....	65
3.1	Methodenfindung zum Nachweis von Tetrazyklinen .....	65
3.2	Methodenfindung zum Nachweis von Sulfonamiden und weiteren Antibiotika .....	66
4	Methodenvalidierung (Wiederfindungsraten/Bestimmbarkeitsgrenzen).....	68
4.1	Tetrazykline.....	68
4.2	Sulfonamide .....	70
4.3	Weitere Antibiotika .....	72
5	Ergebnisse der Lagerungsversuche .....	73
5.1	Lagerverhalten von Chlortetrazyklin in Gülle.....	73
5.2	Lagerverhalten von Sulfonamiden in Gülle .....	74

6	Antibiotikagehalte in Schweinegülle .....	79
6.1	Antibiotikagehalte der Standardgülle .....	79
6.2	Antibiotikagehalte der Gülle des Rückstandsmonitorings .....	79
6.2.1	Vorkommen von Tetrazyklinen .....	79
6.2.2	Vorkommen von Sulfonamiden.....	84
6.2.3	Gehalte an weiteren Antibiotika .....	88
6.2.4	Betrachtung aller untersuchten Antibiotika .....	89
<b>E</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>95</b>
<b>F</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>103</b>
<b>G</b>	<b>Summary .....</b>	<b>105</b>
<b>H</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>107</b>
<b>I</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>117</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Einflussfaktoren auf die Umweltbelastung.....	16
Abbildung 2:	Chemische Strukturen von Tetrazyklinen.....	18
Abbildung 3:	Epi- und Isomerisierung von Chlortetrazyklin.....	20
Abbildung 4:	Dehydration und Epimerisierung von Chlortetrazyklin (CTC).....	21
Abbildung 5:	Grundgerüst der Sulfonamide.....	23
Abbildung 6:	Ansatzpunkte des Sulfonamid-Metabolismus.....	26
Abbildung 7:	Sulfamethazin-N4-acetylierter Metabolit.....	26
Abbildung 8:	Florfenicol.....	27
Abbildung 9:	Enrofloxacin.....	28
Abbildung 10:	Tiamulin.....	29
Abbildung 11:	Eintragspfade von Antibiotika.....	30
Abbildung 12:	Verteilung der Proben auf die Betriebstypen und -größen.....	41
Abbildung 13:	Verteilung der Proben auf die Regierungsbezirke.....	41
Abbildung 14:	Übersicht der Methodenfindung.....	46
Abbildung 15:	Verteilung der Trockenmassegehalte (Boxplot) von GülLEN aus bayerischen Schweinehaltungen.....	55
Abbildung 16:	Massenspektrum (ESP+) von Chlortetrazyklin.....	56
Abbildung 17:	Massenspektrum (ESP+) von Tetrazyklin.....	56
Abbildung 18:	Massenspektrum (ESP+) von Oxytetrazyklin.....	57
Abbildung 19:	Massenspektrum (ESP+) von Doxyzyklin.....	57
Abbildung 20:	Überprüfung der Linearität des Massenspektrometers.....	59
Abbildung 21:	Chromatogramme von Standardlösungen (c = 10 µg/ml) von Chlortetrazyklin, 4-Epi-Chlortetrazyklin und 6-Iso- Chlortetrazyklin.....	60
Abbildung 22:	Massenspektrum (ESP+) von Sulfadiazin (c= 10 µg/ml).....	61
Abbildung 23:	Massenspektren (ESP+) von Florfenicol, Tiamulin und Enrofloxacin (c= 10 µg/ml).....	63
Abbildung 24:	Chromatogramme eines Mischstandards mit Florfenicol, Tiamulin und Enrofloxacin (c = 100 µg/ml).....	64
Abbildung 25:	Chromatogramme eines Chlortetrazyklin (CTC)-Standards, einer CTC-haltigen und einer CTC-freien Probe.....	68

Abbildung 26:	Chromatogramme einer Sulfadiazin/Trimethoprim-haltigen Gülle.....	70
Abbildung 27:	Einfluss der Lagerdauer auf den „Gesamt-CTC-Gehalt“ in Gülle	73
Abbildung 28:	Einfluss der Lagerdauer auf den Gehalt an Sulfadiazin in Gülle .	74
Abbildung 29:	Chromatogramme eines N4-Acetyl-Sulfadiazin Standards und sulfadiazinhaltiger Gülle .....	75
Abbildung 30:	Einfluss der Lagerdauer auf den Gehalt an Trimethoprim in Gülle.....	76
Abbildung 31:	Lagerverhalten von Sulfamerazin in Gülle bei unterschiedlichen Temperaturen ( $\pm$ SD, n=5) .....	78
Abbildung 32:	Lagerverhalten von Sulfamethoxazol in Gülle bei unterschiedlichen Temperaturen ( $\pm$ SD, n=5) .....	78
Abbildung 33:	Kumulative Häufigkeitsverteilung der Tetrazyklingehalte in Schweinegülle (N=380) .....	80
Abbildung 34:	Verteilung der positiven Chlortetrazyklinbefunde in Gülle in Abhängigkeit von Betriebstyp und -größe (Boxplot) .....	81
Abbildung 35:	Verteilung der positiven Tetrazyklinbefunde in Gülle in Abhängigkeit von Betriebstyp und -größe (Boxplot).....	81
Abbildung 36:	Verteilung der Befunde an Chlortetrazyklin („Gesamt-CTC“) auf ausgewählte Konzentrationsbereiche .....	82
Abbildung 37:	Prozentuale Verteilung CTC-positiver Befunde auf ausgewählte Konzentrationsbereiche .....	83
Abbildung 38:	Prozentuale Verteilung TC-positiver Befunde auf ausgewählte Konzentrationsbereiche .....	84
Abbildung 39:	Kumulative Häufigkeitsverteilung der Sulfonamidgehalte in Schweinegülle (N=380).....	86
Abbildung 40:	Verteilung der positiven Sulfamethazin/N4-Actetyl-Sulfamethazin (Metabolit)-Gehalte in Abhängigkeit von Betriebstyp und -größe (Boxplot) .....	87
Abbildung 41:	Prozentuale Verteilung Sulfamethazin-positiver Befunde auf ausgewählte Konzentrationsbereiche .....	88
Abbildung 42:	Prozentuale Verteilung CTC,TC und SMT-positiver Befunde auf ausgewählte Konzentrationsbereiche in Abhängigkeit vom jahreszeitlichen Beprobungszeitraum .....	89

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Europäischer Antibiotikaverbrauch in der Veterinärmedizin .....	14
Tabelle 2:	Jährlicher Verbrauch an Antibiotika in der Veterinärmedizin .....	14
Tabelle 3:	Reinstoffmengen [kg] in tierärztlichen Herstellungsaufträgen in den Untersuchungsgebieten des Weser-Ems Gebietes (1997) ..	15
Tabelle 4:	Summenformeln, Molekulargewichte und pK <sub>s</sub> -Werte von Tetrazyklinen .....	19
Tabelle 5:	Pharmakokinetische Daten der Tetrazykline bei verschiedenen Spezies .....	22
Tabelle 6:	Summenformeln, Molekulargewichte und pK <sub>s</sub> -Werte der untersuchten Sulfonamide und Trimethoprim.....	24
Tabelle 7:	Halbwertszeiten [h] von Sulfonamiden und Trimethoprim bei Mensch und Schwein .....	25
Tabelle 8:	Chemische und physikalische Eigenschaften von Florfenicol .....	27
Tabelle 9:	Chemische und physikalische Eigenschaften von Enrofloxacin ..	28
Tabelle 10:	Chemische und physikalische Eigenschaften von Tiamulinfumarat .....	29
Tabelle 11:	Vorkommen von Antibiotika in Gülle (Fäzes und Urin).....	32
Tabelle 12:	Vorkommen von Antibiotika in Böden und Sedimenten.....	34
Tabelle 13:	Vorkommen von Antibiotika in Oberflächen- / Grundwasser .....	35
Tabelle 14:	Abbau von Antibiotika in Boden/Gülle .....	36
Tabelle 15:	Größenklassen der Betriebstypen .....	40
Tabelle 16:	Getestete Extraktionsmittel für frische und lyophilisierte Gülle ....	48
Tabelle 17:	Gradientenprogramm 1 (Grad1).....	49
Tabelle 18:	Gradientenprogramm 2 (Grad2).....	49
Tabelle 19:	Aufgezeichnete Ionenmassen und Retentionszeiten (Luna C <sub>8</sub> , Grad1, ESP+).....	58
Tabelle 20:	Aufgezeichnete Quasimolekular- und Fragmentionen und Retentionszeiten der Sulfonamide und Trimethoprim (Atlantis C <sub>18</sub> , Grad1, ESP+).....	62
Tabelle 21:	Aufgezeichnete Quasimolekular- und Ionenmassen (Atlantis C <sub>18</sub> , Grad1, ESP+).....	64
Tabelle 22:	Einfluss des Extraktionsmittels auf die Nachweisbarkeit von Chlortetrazyklin.....	66



Tabelle 23:	Wiederfindungsraten für Tetrazykline in Gülle bei verschiedenen Konzentrationsstufen .....	69
Tabelle 24:	Wiederfindungsraten für Sulfonamide und Trimethoprim in Gülle bei verschiedenen Konzentrationsstufen .....	71
Tabelle 25:	Wiederfindungsraten für Florfenicol, Enrofloxacin, Tiamulin in Gülle bei verschiedenen Konzentrationsstufen .....	72
Tabelle 26:	Abbauraten [%] von verschiedenen Sulfonamiden und weiterer Antibiotika in Gülle innerhalb von 16 Wochen bei unterschiedlichen Temperaturen .....	77
Tabelle 27:	Vorkommen von Tetrazyklinen in Schweinegülle (N=380) .....	79
Tabelle 28:	Vorkommen von Sulfonamiden in Schweinegülle (N=380) .....	85
Tabelle 29:	Mehrfachbefunde Tetrazykline und Sulfonamide (alle Betriebstypen und Betriebsgrößen) .....	90
Tabelle 30:	Mehrfachbefunde Tetrazykline und Sulfonamide (Mastbetriebe) .....	91
Tabelle 31:	Mehrfachbefunde Tetrazykline und Sulfonamide (Zuchtbetriebe) .....	92
Tabelle 32:	Mehrfachbefunde Tetrazykline und Sulfonamide (Gemischte Betriebe) .....	93
Tabelle 33:	Anzahl der Befunde in ausgewählten Konzentrationsbereichen .	94
Tabelle 34:	Einteilung der Tetrazyklinbefunde (Summe von TC und CTC) in Schweinegülle (N=380) in Konzentrationsklassen nach DIN 58940 .....	100

## Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ADI	<u>A</u> ceptable <u>d</u> aily <u>i</u> ntake
d	Tag
ESP+	<u>E</u> lectro <u>s</u> pray positiv
FM	Frischmasse
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
geq	Grammequivalent
h	Stunden
HPLC	<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
kg	Kilogramm
LfL	Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
log	Logarithmus
MeOH	Methanol
min	Minute
Mio	Million
MRL	Maximum Residue Level
$\bar{x}$	Mittelwert
PEC	<u>P</u> redicted <u>E</u> nvironmental <u>C</u> oncentration
r	Bestimmtheitsmaß
RP	Reversed Phase
SD	Standardabweichung ( <u>S</u> tandard <u>D</u> eviation)
s	Sekunde
SIR	<u>S</u> electd <u>I</u> on <u>R</u> ecording
TBME	<u>T</u> ertiär- <u>B</u> utyl- <u>M</u> ethyl- <u>E</u> ther
TIC	<u>T</u> otal <u>I</u> on <u>C</u> urrent
TM	Trockenmasse

## A Einleitung

Antibiotika sind Stoffe, die von Pilzen oder Bakterien produziert oder synthetisch hergestellt werden und das Wachstum von Bakterien hemmen (bakteriostatisch) oder diese abtöten (bakterizid) (LÖSCHER & UNGEMACH & KROKER, 2002). Sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin haben sie einen hohen Stellenwert in der Therapie von zahlreichen Erkrankungen.

Das vermehrte Auftreten von Antibiotika-resistenten Keimen hat die Diskussion nach Ursachen hierfür unter anderem auf den Einsatz der Antiinfektiva in der Nutztierhaltung gelenkt. Vor allem deren nicht sachgemäße Anwendung bringt Risiken mit sich. Die Verwendung der Antibiotika als Leistungsförderer im Hinblick auf das Auftreten von Kreuzresistenzen ist ebenso als kritischen zu betrachten. Derzeit sind noch vier Substanzen zugelassen (Avilamycin, Flavophospholipol, Monensin-Natrium, und Salinomycin-Natrium), deren Zulassung jedoch Ende 2005 auslaufen wird (FEUERPFIL et al., 1999). In der Therapie von Nutztieren stellen Antibiotika jedoch unverändert die mengenmäßig bedeutendste Substanzgruppe dar und sind in der Nutztierhaltung aus zahlreichen Gründen unverzichtbar (UNGEMACH, 2000).

Durch die Ausscheidung von Antibiotikarückständen können diese als unveränderte Substanz oder als Metabolisierungsprodukte über den Weg der Abwässer oder durch die Düngung in die Umwelt gelangen und damit die Resistenzproblematik fördern (BERGER et al., 1986; KROKER, 1983).

Wirtschaftsdünger und Klärschlämme, die im größeren Umfang auf die Böden aufgebracht werden, wodurch darin enthaltene Stoffe möglicherweise auch in das Grundwasser gelangen, wurden bisher meist nur auf das Auftreten von Schwermetallen oder Pestiziden untersucht. Hinsichtlich der möglichen Gehalte an Antiinfektiva und deren Metaboliten in Gülle wurden in der Literatur lange Zeit keine Untersuchungen beschrieben.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von sensitiven und robusten Analysemethoden zum Nachweis von Antibiotika in Schweinegülle mittels LC-MS und die Untersuchung von Feldproben aus bayerischer Schweinehaltung auf mögliche Antibiotikarückstände im Wirtschaftsdünger zum Zeitpunkt der Ausbringung.



## **B Literatur**

### **1 Einsatz von Antibiotika in der Tierhaltung**

Antibiotika stellen in der Veterinärmedizin die bedeutendste therapeutische Gruppe dar. Für den Einsatz von Antibiotika in der Therapie von Nutztieren gibt es zahlreiche Gründe. Der Tierschutz steht hierbei an erster Stelle. Aber auch die Verhinderung der Ausbreitung von Krankheiten, sowie die Vermeidung der Übertragung von Zoonoseerregern auf den Menschen begründen den Einsatz dieser Pharmaka. Die Herstellung qualitativ hochwertiger und sicherer Lebensmittel und die Verhütung von ernährungsbedingten Krankheiten stellen weitere wichtige Ziele für die Therapie mit Antibiotika dar. 1998 wurden 3902 t Antibiotika für therapeutische Zwecke in Europa verbraucht (Tabelle 1). Eine Erhebung der BfT (2005) zum Tierarzneimittelleinsatz in Deutschland kommt für den Zeitraum 01/03 bis 12/03 auf eine Gesamtmenge an Antiinfektiva von 668,8 t.

Die Einsatzmengen an Antibiotika hängen vor allem von der Tierart ab. Nach Untersuchungen von RASSOW & SCHAPER (1996) wurden im Weser-Ems Gebiet 75% der Herstellungsaufträge für Schweine, 24% für Geflügel und nur 1% für Rinder und sonstige Tierarten erteilt. Nach GRAFE (2000) entfielen für dieses Gebiet sogar 90% aller Herstellungsaufträge auf die Schweinehaltung. Auch Untersuchungen von UNGEMACH (2000) zeigen, dass der größte Anteil der verbrauchten Antibiotika in der Schweine- und Geflügelhaltung eingesetzt wird, nur 1% werden für weitere Nutztiere genutzt.

Hohe Einsatzmengen entstehen durch den metaphylaktischen Einsatz bei Bestandsbehandlungen und die orale Applikationsmöglichkeit. Antiinfektiva können so arbeitstechnisch einfach über das Futter oder Tränkwasser im Rahmen der Herdenbetreuung verabreicht werden (UNGEMACH, 2000).

Über die eingesetzten Wirkstoffgruppen gibt es keine detaillierten Daten für das gesamte Bundesgebiet, Erhebungen der FEDESA (1999) (Tabelle 1) und Untersuchungen aus Niedersachsen von WINCKLER & GRAFE (2000) bestätigen aber Ergebnisse von RASSOW & SCHAPER (1996), wonach Tetrazykline die häufigste eingesetzte Verbindungsklasse sind.

Tabelle 1: Europäischer Antibiotikaverbrauch in der Veterinärmedizin

Therapie	3493 t (1997)	3902 t (1998)
Futtermittelzusatzstoff	1599 t (1997)	786 t (1998)
Wirkstoffgruppen/Mengen (1997)	[t]	[%]
Tetrazykline	2294	66
Makrolide	424	12
$\beta$ -Laktame	322	10
Aminoglykoside	154	4
Sulfonamide/Trimethoprim	75	2
Fluorquinolone	43	1
Sonstige	182	5

FEDESA, 1999

Untersuchungen zum Antibiotikaverbrauch in Frankreich, Dänemark und Großbritannien zeigen eine große Schwankungsbreite in den Verbrauchsmengen und in den einzelnen Verbindungsklassen (THIELE-BRUHN, 2003). Diese Zahlen unterstreichen aber auch die Bedeutung der Tetrazykline und Sulfonamide (Tabelle 2).

Tabelle 2: Jährlicher Verbrauch an Antibiotika in der Veterinärmedizin

	Frankreich		Dänemark		UK	
	1980		1997		2000	
	t	%	t	%	t	%
Therapeutika	625		57		437	
Tetrazykline	117	19	13	23	228	52
Sulfonamide	139	22	13	23	94	22
Aminoglykoside	57	9	7,7	14	12	3
$\beta$ -Laktame	50	8	15	26	49	11
Makrolide	37	6	1,7	3	41	9
Andere	226	36	6,5	11	12	3

nach THIELE-BRUHN, 2003

Erhebungen von GRAFE (2000) geben detaillierte Angaben zu den Reinstoffmengen der einzelnen Wirkstoffe in tierärztlichen Herstellungsaufträgen, unterschieden nach Ferkeln, Sauen und Mastschweinen (Tabelle 3). So wurden bei Mastschweinen die größten Mengen an Tetrazyklinen (v.a. Chlortetrazyklin und Tetrazyklin) eingesetzt.

Bei den Sulfonamiden zeigt sich ein ähnliches Bild. Hier wurden Sulfadiazin und Sulfamethazin v.a. für Mastschweine am häufigsten in Auftrag gegeben.

Tabelle 3: Reinstoffmengen [kg] in tierärztlichen Herstellungsaufträgen in den Untersuchungsgebieten des Weser-Ems Gebietes (1997)

Antibiotika	Gesamt*	Ferkel	Mastschweine	Sauen
<i>Tierzahl [1000]</i>		1.935	4.309	61
<b>Tetrazykline</b>				
Chlortetrazyklin	14.403	3.295	7.445	103
Tetrazyklin-Hydrochlorid	13.956	2.227	9.057	298
Chlortetrazyklin-Hydrochlorid	9.219	2.665	5.007	28
Oxytetrazyklin	877	220	511	0
Oxytetrazyklin-Hydrochlorid	744	63	379	0
<b>Sulfonamide/Trimethoprim</b>				
Sulfadiazin	6.239	974	4.686	206
Sulfamethazin	5.858	1.575	3.551	33
Trimethoprim	1.267	215	971	41
Sulfamerazin	623	100	187	1
Sulfathiazol	264	123	141	0
Sonstige Sulfonamide	101	49	52	0
Sulfaquinoxalin	50	0	3	0
Sulfadimethoxin	23	0	19	0
<b>Chinolone</b>				
Enrofloxacin	6	2	2	2
<b>Sonstige</b>				
Tiamulin	969	202	731	20

\* Ferkel, Mastschweine, Sauen, Broiler, Puten, Legehennen, Rinder

nach GRAFE, 2000

## 2 Einflussfaktoren der Umweltbelastung durch Antibiotika

Durch den Einsatz von Antibiotika kann es zu Rückständen in den Ausscheidungsprodukten kommen, die wiederum zu einer Umweltbelastung führen können. Diese wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, wobei qualitative wie auch quantitative Aspekte eine große Rolle spielen. Für eine Analyse der kritischen Substanzen im Hinblick auf deren Umweltsrelevanz sind daher Eigenschaften des Ökosystems, der chemischen Substanzen, Parameter des Tieres und die Gegebenheiten des landwirtschaftlichen Betriebes zu beachten. Abbildung 1 fasst die wichtigsten Faktoren, die sich auch gegenseitig beeinflussen können, zusammen.

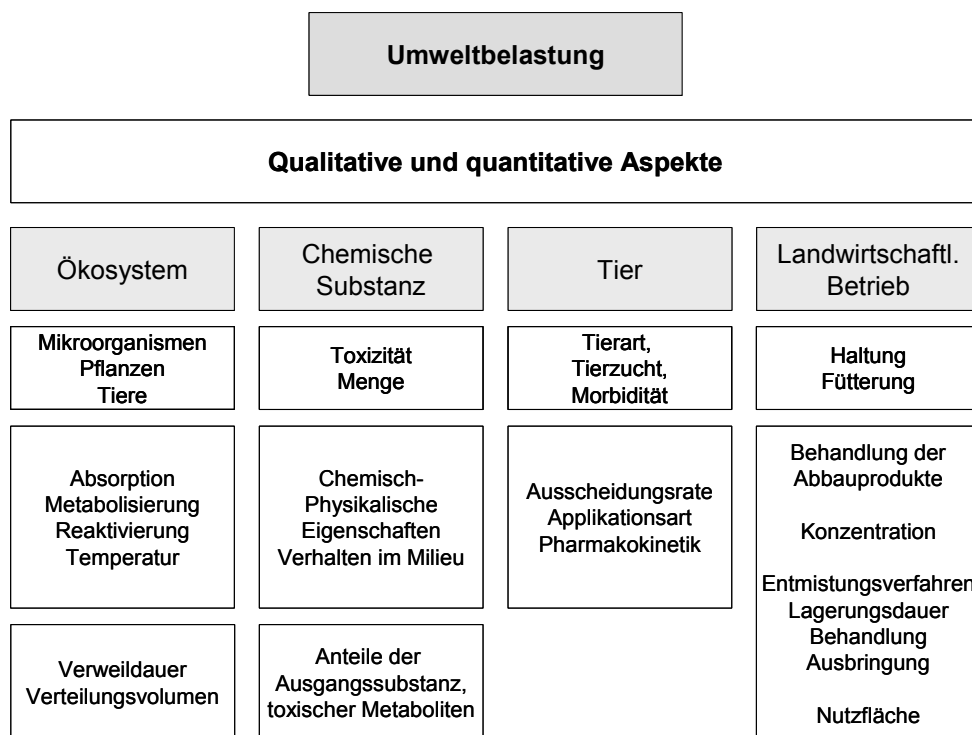


Abbildung 1: Einflussfaktoren auf die Umweltbelastung  
(nach GRAFE, 2000)

In den verschiedenen Ökosystemen spielen sowohl zahlreiche Biotransformationsprozesse (Metabolisierung, Reaktivierung, mikrobieller Abbau) als auch Absorptionsprozesse eine große Rolle, wobei die Verweildauer und das Verteilungsvolumen diese beeinflussen. Aber auch die chemisch-physikalischen Eigenschaften (pH-Wert, Temperatur, UV-Licht) beeinflussen die Umweltstabilität.

Für die Beurteilung einer möglichen Umweltbelastung sind vor allem chemische Substanzen, die persistieren können, von Relevanz. So stellen  $\beta$ -Laktame und



Cephalosporine zwar hinsichtlich der Einsatzmenge bedeutende Substanzgruppen dar, auf Grund ihrer Labilität sind sie jedoch unter umweltrelevanten Aspekten nur von untergeordneter Bedeutung. Dagegen sind die therapeutischen Gruppen der Tetrazykline (Chlortetrazyklin, Tetrazyklin), Sulfonamide (z.B. Sulfadiazin, Sulfamethazin) und Pleuromutiline (z.B. Tiamulin) als relativ stabile Verbindungen einzustufen und damit von weitaus größerer Relevanz (CHRISTIAN et al., 2003; GÖBEL et al., 2004; HIRSCH et al., 1998,1999; MCARDELL, 2003; OKA et al., 1995; XIU-SHENG et al., 2004).

Ebenso beeinflussen Parameter, die vom Tier bestimmt werden (Art, Pharmakokinetik), die von den Rückständen ausgehende Umweltbelastung. Insbesondere die Metaboliten sind auf Grund ihrer zur Ausgangssubstanz differierenden Eigenschaften von besonderem Interesse, da in Phase I und II wasserlösliche Verbindungen entstehen, die unter Umständen in der Umwelt toxischer wirken können als die Ausgangssubstanz (HALLING-SØRENSEN et al., 1998). Für einige Verbindungen konnte auch eine Reaktivierung im Umweltkompartiment nachgewiesen werden. So wird in Gülle der Phase II Metabolit N4-Acetyl-Sulfamethazin durch bakteriellen Umsatz zur Ausgangsverbindung Sulfamethazin rückgewandelt (BERGER et al., 1986).

Auch Aspekte der Tierhaltungsform und des Tiermanagements des landwirtschaftlichen Betriebs beeinflussen die eingesetzten Antibiotikamengen. Sind auf Grund der unterschiedlichen Herkunft der Ferkel häufig so genannte Einstallprophylaxen nötig (BLAHA, 1996; SCHWARZ et al., 2000), so können Rückstände der Medikamente in größerem Maß in die Umwelt gelangen. Entmistungsverfahren, Lagerkapazität für Gülle (damit Lagerungsdauer) und Güllebehandlungsverfahren (Zusätze, Belüften, Biogasverfahren) beeinflussen zudem die möglichen Rückstandslasten (LANGHAMMER, 1989).

Bei der Beurteilung einer möglichen Umweltbelastung durch Antibiotikarückstände ist eine differenzierte Betrachtungsweise der zahlreichen Parameter nötig.



Tabelle 4: Summenformeln, Molekulargewichte und pK<sub>s</sub>-Werte von Tetrazyklinen

	CTC	TC	OTC	DOXY
Summenformel	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>
Molekulargewicht [g/mol]	478	444	460	444
pK <sub>s</sub>	3,3	7,7	9,3	-
Cas-No.	57-62-5	60-54-8	79-57-2	17086-28-1

### Physikalische Eigenschaften

Tetrazykline sind gelbe, kristalline und lichtempfindliche Verbindungen, deren Schmelz- und Zersetzungspunkte zwischen 165°C und 185°C liegen (DÜRKHEIMER, 1975; ZURHELLE, 2000).

### Chemische Eigenschaften

Auf Grund der sauren OH-Gruppen und des basischen Dimethylaminorestes sind Tetrazykline amphotere Verbindungen, die sowohl mit Säuren als auch mit Basen wasserlösliche Salze (v.a. Hydrochloride) bilden. Im Neutralen sind die Tetrazykline wenig wasserlöslich, weshalb sie meist als Hydrochloride verwendet werden (DÜRKHEIMER, 1975; WEIDENBERG, 2002; ZURHELLE, 2000).

Aufgrund der Hydroxyl- und Ketogruppen können Tetrazykline mit bi- und trivalenten Kationen (Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Bi<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>) stabile Chelatkomplexe bilden. Des Weiteren binden sie an Proteine und Silanolgruppen (OKA et al., 2000).

### Stabilität

Unter Licht kommt es durch Photolyse von Tetrazyklinen zu 4-Dedimethylamino- und 5a, 6-Anhydro-Tetrazyklinen sowie Quinonen. Bei feuchter Lagerung entstehen über Dehydration Epianhydro- oder Anhydroprodukte (HALLING-SØRENSEN, 2002; OKA et al., 1995; SCHADEWINKEL-SCHERKEL & SCHERKEL, 1995; LÖSCHER & UNGEMACH & KROKER, 2002).

### Epimerisierung, Isomerisierung

Im pH-Bereich zwischen 2 bis 6 kommt es zu reversiblen Umlagerungsreaktionen von CTC zu seinen epimeren Verbindungen (Abbildung 3). Ein Unterschied besteht lediglich in der Stellung der Dimethylaminogruppe am C4. Im alkalischen

Bereich (bei CTC bereits ab pH 7) kommt es sowohl bei CTC als auch bei 4-Epi-CTC zu einer irreversiblen Isomerisierung an der Hydroxylgruppe des C6. Diese isomeren Verbindungen stehen ebenfalls in einer Gleichgewichtsreaktion zu ihren epimeren Dependants im sauren Milieu (DÜRKHEIMER, 1975).

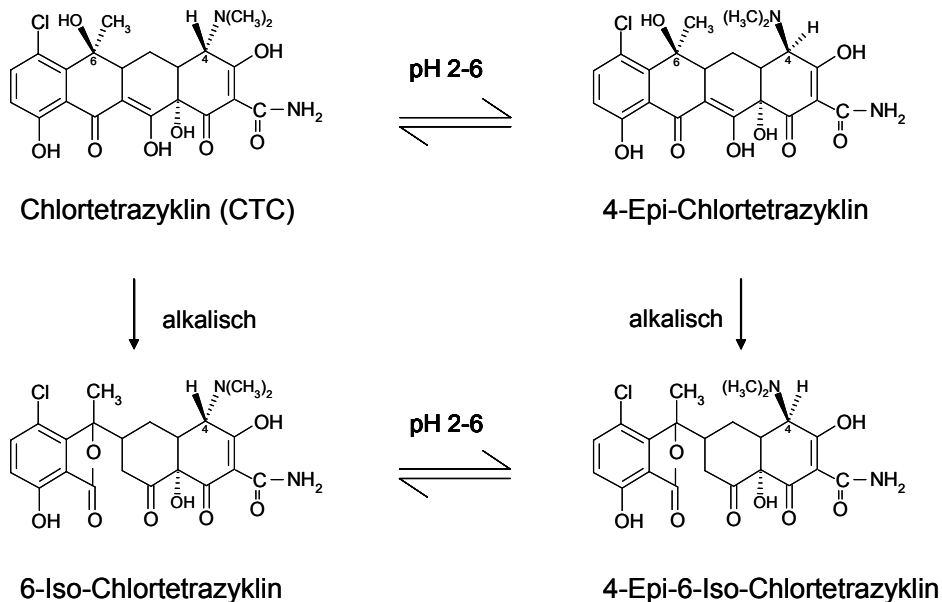


Abbildung 3: Epi- und Isomerisierung von Chlortetrazyklin

Nach Untersuchungen der EMEA (1997, 2000) werden diese Epimerverbindungen als Präparationsartefakt angesehen, die in einer Gleichgewichtsreaktion zur Ausgangssubstanz stehen. Über den Entstehungsort dieser Verbindungen besteht allerdings keine Einigkeit. Auch die toxikologischen Eigenschaften sind bisher noch nicht bekannt. Die EU hat als maximale Rückstandsgrenzen (MRL) den Wert für CTC in Eiern bei 200 µg/kg festgelegt, und zwar als Summe von CTC und 4-Epi CTC (KENNEDY et al., 1998a, b; KROKER, 2002).

### Dehydration

Im stark sauren Bereich (pH 1) kommt es zu einer irreversiblen Dehydration von Chlortetrazyklin und seinem Epimer (Abbildung 4).

Auch diese Anhydroverbindung steht in einer Gleichgewichtsreaktion mit ihrem Epimer im pH-Bereich zwischen 2 und 6.

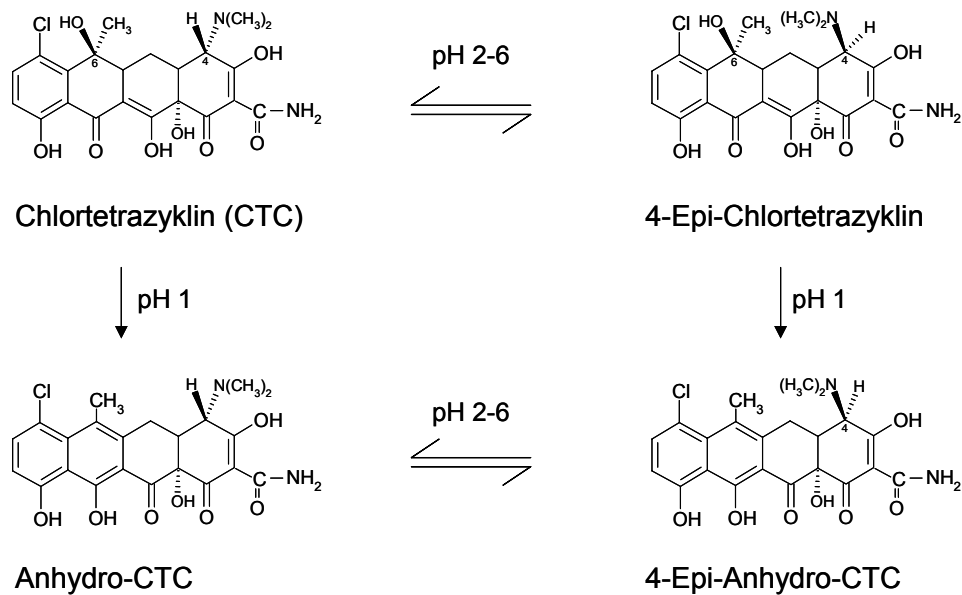


Abbildung 4: Dehydratation und Epimerisierung von Chlortetracyclin (CTC)

#### Bakterielle Wirkungsmechanismen:

Durch Bindung an die 30S Untereinheit der 70S Ribosomen wird die Proteinsynthese gehemmt, indem entweder die Codon-Anticodon-Interaktion zwischen Ribosom und t-RNA reversibel verhindert oder die Interaktion des Ribosoms mit dem Elongationsfaktor EF-Tu gehemmt wird (ALEXANDER & ESTLER & LEGLER, 1995).

Das Wirkungsspektrum umfasst sowohl gram-positive als auch gram-negative Bakterien (z.B. *E. coli*, *Hämophilus*, *Vibrio* spp., *Brucella* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp.) sowie Rickettsien, Mycoplasmen, Chlamydien und einige Protozoen (Plasmodien). Die ursprünglich breite Wirksamkeit wird allerdings durch das Auftreten von Resistenzen bei verschiedenen Bakterienspezies vermindert. Gegenüber den verschiedenen Tetracyclinen können zudem Kreuzresistenzen vorliegen, weshalb ein Nachweis der Erregersensitivität hier besonders erforderlich ist (ALEXANDER & ESTLER & LEGLER, 1995; LÖSCHER & UNGEMACH & KROKER, 2002; PARFITT, 1999; SCHADEWINKEL-SCHERKEL & SCHERKEL, 1995).

#### **3.1.2 Pharmakologische Parameter**

Tetracycline werden speziesabhängig unterschiedlich stark aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert (Tabelle 5). Die Plasmaproteinbindung und das Eliminationsverhalten sind dabei abhängig von der Lipophilie der Derivate. Die Elimination erfolgt teils renal, teils enteral über die Galle mit enterohepatischem Kreislauf (KROKER, 1983; SCHADEWINKEL-SCHERKEL & SCHERKEL, 1995; LÖSCHER & UNGEMACH & KROKER, 2002; FORTH et al., 2001).

Tabelle 5: Pharmakokinetische Daten der Tetrazykline bei verschiedenen Spezies

Tetrazykline	Spezies	Enterale Resorption [%]	Halbwertszeit (Blut) [h]	Plasma-Proteinbindung [%]	Renale Ausscheidung [%]
CTC	Mensch	25-30	5-6	50	20
	Hund	24	5	61	
	Kalb	47	9	38	
OTC	Mensch	60	8-10	< 30	30
	Pferd		11		
	Huhn		3		
	Schwein				
TC	Mensch	80	10	25-55	40
	Hund	50	5	70-80	56-85
	Kalb		10	36	
Doxy	Mensch	> 90	12-18	80-90	25
	Hund	70	10		
	Katze	45	8		

nach KROKER, 1996; SCHADEWINKEL-SCHERKEL & SCHERKEL, 1995

Nach MICROMEDEX MONOGRAPHS (2003) sind für Tetrazykline bei keiner der untersuchten Spezies signifikante Mengen an Biotransformationsprodukten vor der Elimination bekannt. Auch nach KROKER (1983, 1996) werden Tetrazykline (CTC, TC und OTC) in aktiver Form und kaum metabolisiert via Fäzes in Konzentrationen bis zu 1 mg/g ausgeschieden.

Andere Untersuchungen sprechen von einer Metabolisierung der Tetrazykline in Epimere, Isomere und Anhydroverbindungen (LÖSCHER & UNGEMACH & KROKER, 2002; SCHADEWINKEL-SCHERKEL & SCHERKEL, 1995; KÜHNE et al., 2000; KENNEDY et al., 1998 a, b). Nach GROTE et al. (2004) werden diese Verbindungen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gebildet und sollten daher bei Rückstandsuntersuchungen (z.B. in tierischen Geweben) berücksichtigt werden. Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit bestätigen die Notwendigkeit der Berücksichtigung der Epimere bei einer Risikobewertung (z.B. bei der Festlegung von ADI-Werten) (SCHEDEL, 2000).

## 3.2 Sulfonamide

### 3.2.1 Chemische und physikalische Eigenschaften

Unter dem Begriff der Sulfonamide werden viele strukturell sehr ähnliche Verbindungen zusammengefasst, die durch eine p- oder 4-Aminobenzolsulfonamid-Gruppe charakterisiert wird (Abbildung 5) (RÖMPP, 1995). Auf Grund der unterschiedlichen Reste an der Position N<sub>1</sub> unterscheiden sie sich in ihren Molekulargewichten, aber auch in ihren physikalischen/chemischen Eigenschaften wie z.B. dem pK<sub>s</sub>-Wert (Tabelle 6).

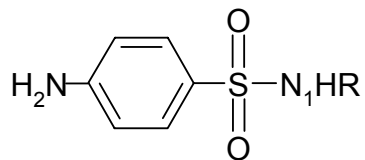


Abbildung 5: Grundgerüst der Sulfonamide

Sulfonamide werden vor allem als antibakterielle Chemotherapeutika, zum Teil als orale Antidiabetika (Sulfonylharnstoffe), Diuretika und Carboanhydrasehemmstoffe therapeutisch angewendet (PSCHYREMBEL, 1986).

Tabelle 6: Summenformeln, Molekulargewichte und pK<sub>s</sub>-Werte der untersuchten Sulfonamide und Trimethoprim

Substanz		Summenformel	Molekulargewicht [g/mol]	pK <sub>s</sub> *	Cas-No.
Sulfadiazin	(SD)	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	250,3	6,4	68-35-9
Sulfaguanidin	(SG)	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	214,2	11,3	57-67-0
Sulfathiazol	(ST)	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	255,3	7,1	72-14-0
Sulfamerazin	(SM)	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	264,3	-	127-79-7
Sulfaphenazol	(SP)	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	314,4	-	526-08-9
Sulfadimethoxin	(SDM)	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	310,3	6,2	120-11-2
Sulfamethazin	(SMT)	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	278,3	7,4	57-68-1
N4-Acetyl-SMT	(N4-SMT)	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	321,0	7,1	100-90-3
Sulfamethoxazol	(SMX)	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	253,3	5,7	723-46-6
Sulfapyridin	(SPY)	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	249,3	8,4	144-82-2
Sulfamethoxy-pyridazin	(SMP)	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	280,3	-	80-35-3
Sulfisomedin	(SI)	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	278,3	-	515-64-0
Sulfameter	(Smeter)	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	280,3	-	651-06-9
Sulfadoxin	(SDX)	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	310,3	6,3	2447-57-6
Trimethoprim	(TM)	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	290,3	7,6	738-70-5

\*nach HARTIG, 2000

### Löslichkeit

Sulfonamide sind in Wasser nur schwer löslich, ihre Natrium-Salze dagegen gut (MICROMEDEX MONOGRAPHS, 2003; HARTIG, 2000).

### Wirkung

Die Wirkung der Sulfonamide beruht auf einer kompetitiven Hemmung der Dihydropteroinsäure-Synthetase durch Substratkonkurrenz zur p-Aminobenzoesäure. Dadurch kommt es im wachsenden Mikroorganismus zu einer Unterdrückung der Folsäurebildung, was sich wiederum auf die Eiweiß- sowie auf die DNA- und RNA-Synthese auswirkt. Hierdurch wird die bakterielle Entwicklung gehemmt, so dass die körpereigenen Abwehrkräfte in der Lage sind, die Bakterien abzutöten. Sulfonamide zeichnen sich durch ein breites Wirkungsspektrum aus. Es sind jedoch nur Bakterien empfindlich, die Folsäure selbst synthetisieren müssen.



Erreger, die diese aus ihrer Umgebung aufnehmen und nutzen können, besitzen eine natürliche Resistenz (LÖSCHER & UNGEMACH & KROKER, 2002; SCHADEWINKEL-SCHERKEL & SCHERKEL, 1995).

### 3.2.2 Pharmakologische Parameter

Sulfonamide werden in der Humanmedizin auf Grund ihrer sehr stark differierenden Halbwertszeit in kurz-, mittel- und langwirkende Verbindungen eingeteilt. Diese Einstufung ist jedoch nicht ohne weiteres auf den Tierbereich übertragbar, was die großen Unterschiede hinsichtlich der Halbwertszeiten zeigen (Tabelle 7).

Tabelle 7: Halbwertszeiten [h] von Sulfonamiden und Trimethoprim bei Mensch und Schwein

Substanz	Mensch	Schwein
Sulfachloropyridazin	8	6
Sulfadiazin	10-24	8
Sulfadimethoxin	40	6-17
Sulfamethazin	3-14	9-16
Sulfadoxin	170-200	6-9
Sulfisomedin	7	11
Sulfamerazin	15-30	8-21
Sulfamethoxazol	8-12	3
Sulfamethoxypyridazin	36-40	10
Sulfaphenazol	9-10	4
Sulfapyridin	-	12
Sulfathiazol	4	2-11
Trimethoprim	10	2,5

nach LÖSCHER & UNGEMACH & KROKER, 2002

### Metabolisierung

Im Intermediärstoffwechsel werden die Sulfonamide an der N4 Position acetyliert und/oder, in geringem Umfang, glucuronidiert (Abbildung 6). Die unmetabolisierten Verbindungen werden in freier als auch konjugierter Form bis zu 80% über die Nieren ausgeschieden. Die acetylierten Produkte werden glomerulär filtriert und tubulär sezerniert (HARTIG, 2000; SCHADEWINKEL-SCHERKEL & SCHERKEL, 1995).

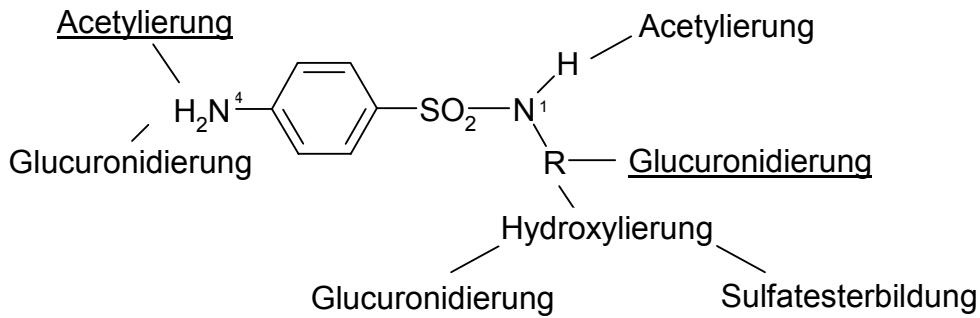


Abbildung 6: Ansatzpunkte des Sulfonamid-Metabolismus  
(Hauptstoffwechselwege sind unterstrichen) (nach FORTH, 1996)

Die Metabolisierung soll hier beispielhaft anhand des Sulfamethazins detaillierter beschrieben werden. 24,5% des Sulfamethazins werden beim Schwein unmetabolisiert, 52,1% in metabolisierter Form renal ausgeschieden (MICROMEDEX MONOGRAPHS, 2003). Bei Untersuchungen von BERGER et al. (1986) konnten 46% der verabreichten Dosis an Sulfamethazin in der Gülle detektiert werden, 50% davon in acetylierter Form. Auch Versuche mit  $C^{14}$  markiertem Sulfamethazin bestätigen die Metabolisierung von Sulfamethazin zu N4-Acetyl-Sulfamethazin, welches im Urin und Fäzes von Schweinen nachgewiesen werden konnten (Abbildung 7). N4-glucuronidierte Metabolite konnten nur im Gewebe detektiert werden (PAULSON et al., 1980).

Die durch die Acetylierung mikrobiell unwirksam gewordenen Verbindungen können bei der Lagerung durch bakterielle Aktivität wieder aufgespalten und damit als Wirkstoffe reaktiviert werden (LANGHAMMER, 1989; KROKER, 1983; BERGER et al., 1986).

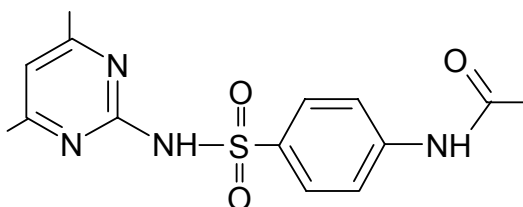


Abbildung 7: Sulfamethazin-N4-acetylierter Metabolit  
[(N4-Acetyl-N1-(4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl) sulfanilamid)]

### 3.3 Weitere in der Schweinehaltung verwendete Antibiotika

#### 3.3.1 Fenicole: Florfenicol

Florfenicol (Abbildung 8) ist ein Vertreter der Gruppe der Fenicole, zu der auch Chloramphenicol gehört. Dieses ist aufgrund seiner Nebenwirkungen (u.a. aplastische Anämie) in der Anwendung bei lebensmittelliefernden Tieren seit 1994 verboten (LÖSCHER & UNGEMACH & KROKER, 2002). Die chemisch/physikalischen Eigenschaften sind in Tabelle 8 dargestellt.

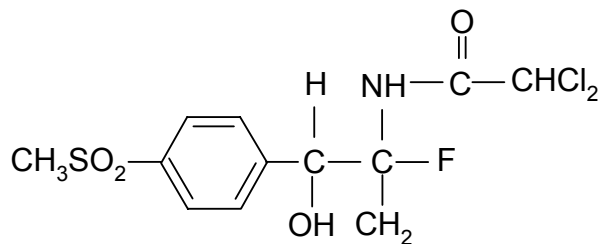


Abbildung 8: Florfenicol

Tabelle 8: Chemische und physikalische Eigenschaften von Florfenicol

Summenformel	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> FNO <sub>4</sub> S
Molekulargewicht	358,2
Löslichkeit	Löslich in Wasser
Cas-No	0076639-94-6

MICROMEDEX MONOGRAPHS, 2003

Der Wirkungsmechanismus von Florfenicol entspricht dem des Chloramphenicols. Durch die Bindung der Seitenkette an die 50S Untereinheit der Ribosomen und die Hemmung der Peptidyltransferaseaktivität wird die Bindung der Aminosäuresubstrate an den Enzymkomplex gestört und die Peptidkettenbindung inhibiert. Durch diese Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese gehören Fenicole zum bakterio-statischen Wirkungstyp (SCHADEWINKEL-SCHERKEL & SCHERKEL, 1995).

Beim Schwein wird Florfenicol zur Therapie bei Infektionen des Respirationstraktes mit *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Pasteurellen und *Mycoplasma hyopneumoniae* eingesetzt (LÖSCHER & UNGEMACH & KROKER, 2002). Von den gebildeten Metaboliten ist das Florfenicol-Amin im Lebergewebe am stabilsten (SAMS, 1995).

### 3.3.2 Fluorquinolone: Enrofloxacin

Die Fluorquinolone sind die wichtigsten Vertreter der Gruppe der Gyrasehemmer. Enrofloxacin (Abbildung 9) ist ein häufig eingesetztes Präparat aus dieser Gruppe. Es zeichnet sich strukturell durch eine Carboxylgruppe an Position 3, eine Ketogruppe an Position 4 sowie ein Stickstoffatom an Position 1 aus; es ist in Position 6 fluoriert und besitzt in Position 7 einen Piperazinring. Fluorquinolone wirken u.a. durch die Hemmung der bakteriellen DNA-Gyrase, wodurch das „super coiling“ inhibiert wird (bakteriostatische Wirkung). Noch nicht genauer bekannte Mechanismen führen zusätzlich zu einer bakteriziden Wirkung. Fluorquinolone zeichnen sich durch eine hohe Bioverfügbarkeit nach oraler Verabreichung aus. Die Halbwertszeiten liegen zwischen 2 und 7 Stunden bei Haustieren (Hund, Katze bzw. Schwein und Rind), die Exkretion erfolgt renal. Als Hauptmetabolit von Enrofloxacin entsteht durch Dealkylierung Ciprofloxacin, welches in seiner chemischen Wirksamkeit der Ausgangsverbindung vergleichbar ist, jedoch ausschließlich in der Humanmedizin eingesetzt wird. Enrofloxacin ist bei Ferkeln und Schweinen nur zur Behandlung von *E. coli*-induzierten Erkrankungen zugelassen (LÖSCHER & UNGEMACH & KROKER, 2002; SCHADEWINKEL-SCHERKEL & SCHERKEL, 1995).

Fluorquinolone sind chemisch sehr stabil und gegen Hydrolyse und hohe Temperaturen unempfindlich. Unter UV Licht können sie jedoch abgebaut werden (THIELE-BRUHN, 2003).

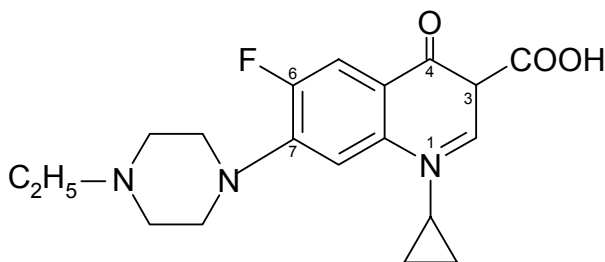


Abbildung 9: Enrofloxacin

Tabelle 9: Chemische und physikalische Eigenschaften von Enrofloxacin

Summenformel	$C_{10}H_{22}FN_3O_3$
Molekulargewicht	359,4
Löslichkeit	Löslich in Wasser
Cas-No	9306-60-6

### 3.3.3 Pleuromutiline: Tiamulin

Tiamulin (Abbildung 10) ist ein semisynthetisches Derivat des Antiinfektivums Pleuromutilin. Auf Grund seiner Bindung an die ribosomale 50S Untereinheit und die daraus resultierende Hemmung der Peptidyltransferase wirkt es durch den Proteinsyntheseabbruch sowohl auf gram-positive als auch auf gram-negative Erreger bakteriostatisch. Anwendungsgebiete beim Schwein sind Dysenterie, enzootische Pneumonie und *Haemophilus*-Pleuropneumonie. Oral verabreicht wird es gut resorbiert. Tiamulin kann zu zahlreichen Metaboliten (z.B. 8-Hydroxymutilin) verstoffwechselt werden; einige von ihnen sind noch antibakteriell wirksam. Die Exkretion erfolgt über Kot und Harn (SCHADEWINKEL-SCHERKEL & SCHERKEL, 1995).

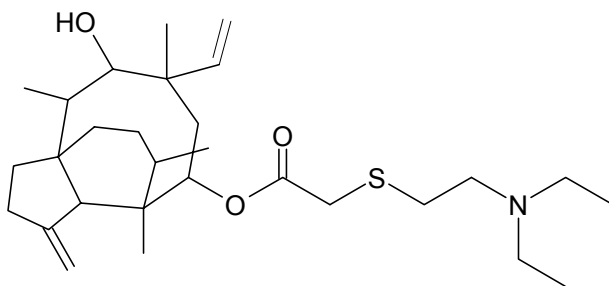


Abbildung 10: Tiamulin

Tabelle 10: Chemische und physikalische Eigenschaften von Tiamulinfumarat

Summenformel	$C_{32}H_{51}NO_8S$
Molekulargewicht	609,8
Löslichkeit	Löslich in Wasser
Cas-No	55297-96-6

MICROMEDEX MONOGRAPHS, 2003

#### 4 Vorkommen von Antibiotika in der Umwelt

Antibiotika und deren Metaboliten können über mehrere Eintragspfade in die Umwelt gelangen. Zum einen über Kommunal- oder Hospitalabwässer durch den Einsatz in der Humanmedizin, zum anderen durch die Ausscheidungsprodukte von behandelten Nutztieren (JØRGENSEN & HALLING-SØRENSEN, 2000) (Abbildung 11).

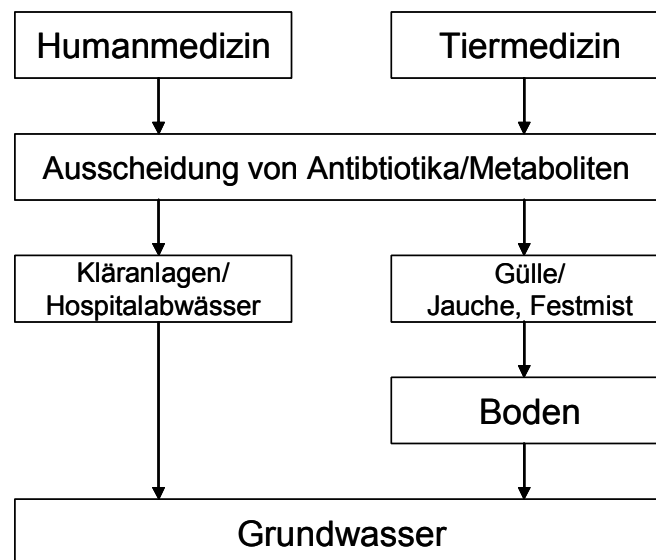


Abbildung 11: Eintragspfade von Antibiotika  
(nach HALLING-SØRENSEN, 1998)

##### 4.1 Vorkommen in Gülle

Gülle stellt in der Landwirtschaft einen bedeutenden Faktor in der Düngung dar. In Bayern fallen jährlich 42,4 Mio. t an, davon 7,8 Mio. t Schweinegülle (5% Trockensubstanz) (SCHWAB & DÖHLER, 2000). Bisher gab es nur wenige Untersuchungen, die Wirtschaftsdünger auf das Vorkommen von Rückständen an Antibiotika aus der Therapie von Nutztieren untersucht haben. Meist konzentrierten sich die Untersuchungen auf das Vorkommen von illegal eingesetzten Substanzen oder gesetzlich vorgeschriebene Maximalgehalte (MRL = Maximum Residue Levels) im tierischen Gewebe im Rahmen des Verbraucherschutzes.

Untersuchungen von LANGHAMMER (1988) zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe zeigten, dass diese Verbindungen unverändert oder zum Teil metabolisiert ausgeschieden werden. Zudem konnte während der Güllelagerung eine Rückaktivierung des N4-Acetyl-Sulfamethazins zur Ausgangssubstanz dokumentiert werden.

HALLER et al. (2001, 2002) beschäftigten sich mit der Analyse von Sulfonamiden, da diese unter Umweltbedingungen, im Gegensatz zu Penicillinen, Aminoglykosiden oder Makroliden, als stabil gelten. In den sechs untersuchten Gülle aus Betrieben, in denen Medizinalfutter angewendet wurde, konnten Sulfamethazin und der N4-Acetyl-Metabolit in Konzentrationen bis zu 8,7 bzw. 2,6 mg/kg Frischgülle (TM 3,3%) detektiert werden. Sulfathiazol konnte mit Gehalten von 0,1 bis 12,4 mg/kg nachgewiesen werden. Der Wirkstoff Trimethoprim hingegen, der als Synergist zu Sulfonamiden eingesetzt wird, konnte nur in einer Probe unterhalb der Bestimmbarkeitsgrenze (0,1 mg/kg) gefunden werden. Als Grund geben HALLER et al. (2002) eine Sorption im Darm und einen schnellen Abbau in Gülle an. Dies wurde in Untersuchungen von PFEIFER et al. (2002) bestätigt.

Ein Güllescreening (N=181) in Nordrhein-Westfalen von GRAFE (2000) ergab für den Nachweis von Tetrazyklinen 43 positive Befunde in Konzentrationen zwischen 0,6 mg/kg (Bestimmbarkeitsgrenze) und 66 mg/kg.

In Analysen von HAMSCHER et al. (2000 a, b; 2002) konnte Chlortetrazyklin in Gülle mit Konzentrationen bis zu 1 mg/kg bestimmt werden, Tetrazyklin wurde in Konzentrationen bis zu 4 mg/kg detektiert.

SCHLÜSENER et al. (2003) wiesen in Gülleproben 0,04 mg/kg Tiamulin und 0,01 mg/kg Salinomycin nach. Da hier höhere Gehalte erwartet wurden, gingen die Autoren davon aus, dass diese Substanzen in Gülle nicht sehr stabil sind.

ENGELS (2004) konnte in Gülleproben aus dem Weser-Ems Gebiet (N=168, 1999/2000; N=176, 2000/2001) in zahlreichen Proben Tetrazykline (TC ca. 50% positive Befunde) in Konzentrationen bis zu 46 mg/kg bestimmen. Bei dieser Untersuchung wurde eine Bestimmbarkeitsgrenze von 0,8 mg/kg erreicht. Sulfonamide (Sulfamethazin und Sulfadiazin) konnten in Konzentrationen bis zu 235 mg/kg nachgewiesen werden. Aufgrund der ansonsten geringeren Gehalte schloss ENGELS auf eine verminderte Stabilität der Sulfonamide in Gülle.

Diese und weitere Untersuchungen zum Vorkommen von Antibiotika in Gülle sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Vorkommen von Antibiotika in Gülle (Fäzes und Urin)

Substanz (Probenanzahl)	Konzentration	Nachweis- grenze *	Herkunft	Referenz
<b>Gülle</b>				
Chlortetrazyklin  (N=176, 18 positiv) (N=168, 26 positiv)	0,1 mg/kg		D	HAMSCHER et al., 2002
	0,008 mg/kg	-	D	HAMSCHER et al., 2000b
	0,002-1 mg/kg	-	D	HAMSCHER et al., 2000b
	0,02 mg/g (Geflügel)	-	CA	WARMAN & THOMAS, 1981
	0,8-28 mg/kg	0,8	D-WE	ENGELS, 2004
	0,8-330 mg/kg	0,8	D-WE	ENGELS, 2004
Tetrazyklin	4 mg/kg		D	HAMSCHER et al., 2002
	0,003 mg/kg	-	D	HAMSCHER et al., 2000b
	0,04-0,13 mg/kg	-	D	HAMSCHER et al., 2000b
	0,01-0,73 g/m <sup>3</sup>	0,01	USA	MEYER et al., 2000
	0,003-12 g/m <sup>3</sup>	0,003	USA	ZHU et al., 2001
(N=181, 43 positiv)	0,6-66 mg/kg	0,6	D-WE	GRAFE, 2000
(N=62, 9 positiv)	5-24 mg/kg	-	D	WINCKLER&GRAFE, 2000
(N=168, 65 positiv, N=176, 88 positiv)	0,8-46 mg/kg	0,8	D-WE	ENGELS, 2004
Sulfonamide (N=6, 6 SMT positiv, 4 ST positiv, 1 TM positiv)	0,1-20 mg/l (SMT,ST, TM)	0,1	CH	HALLER et al., 2002
	0,7-4,0 mg/kg	-	D-NS	HÖPER, 2002
Sulfadiazin (N=4, 2 positiv)	0,3-0,6 mg/kg	-	D-NS	HÖPER, 2002
	0,01-0,08	0,005	D	PFEIFER et al., 2002
(N=176, 86 positiv)	0,8-40 mg/kg	0,8	D-WE	ENGELS, 2004
(N=168, 14 positiv)	0,8-235 mg/kg	0,8	D-WE	ENGELS, 2004
Sulfamethazin (N=4, 2 positiv)	2,9 mg/kg	-	D-NS	HÖPER, 2002
	0,01-0,06 mg/kg	0,005	D	PFEIFER et al., 2002
(N=6)	1-2 mg/kg	-	D-NW	CHRISTIAN et al., 2003
(N=176, 88 positiv)	0,8-167 mg/kg	0,8	D-WE	ENGELS, 2004
(N=168, 96 positiv)	0,8-62 mg/kg	0,8	D-WE	ENGELS, 2004
Sulfadimethoxin	300-900 mg/kg	-	I	MIGLIORE et al., 1995
Tiamulin (N=4, 1 positiv)	0,04 mg/kg	0,0004	D	SCHLÜSENER et al., 2003
Salinomycin	0,01 mg/kg	0,003	D	SCHLÜSENER et al., 2003
<b>Abkürzungen:</b>				
<i>D</i>	<i>Deutschland</i>		<i>CA</i>	<i>Canada</i>
<i>D-NW</i>	<i>Nordrhein-Westfalen</i>		<i>I</i>	<i>Italien</i>
<i>D-NS</i>	<i>Niedersachsen</i>		<i>CH</i>	<i>Schweiz</i>
<i>D-WE</i>	<i>Weser-Ems</i>			

nach BOXALL et al., 2003

\* gleiche Einheit wie Konzentration



## 4.2 Vorkommen in Böden

Im Boden spielen vor allem Sorptionsprozesse eine große Rolle. Diese werden wiederum beeinflusst von der Molekularstruktur, den physikalisch-chemischen Eigenschaften und den funktionellen Gruppen an organisch-mineralischen Oberflächen. Diese Prozesse sind stark pH abhängig (DÍAZ-CRUZ, 2003; THIELE-BRUHN, 2004).

Insbesondere für die Tetrazykline wurde ein starkes Bindungsvermögen an die Bodenmatrix beobachtet, jedoch sorbieren auch Sulfonamide via Kationenaustausch/-bindung, Oberflächenkomplexen und Wasserstoffbindungen an Böden (BOXALL et al., 2002; TOLLS, 2001).

Untersuchungen von HAMSCHER et al. (2002) zeigten in sandigen Böden nach einer Düngung mit 40 bzw. 30 m<sup>3</sup> antibiotikahaltiger Gülle (TC: 4 mg/kg, CTC: 0,1 mg/kg) durchschnittliche Tetrazyklingehalte von 86,2 µg/kg in einer Tiefe von 0 bis 10 cm. In 10 bis 20 cm konnten Gehalte von 198,7 µg/kg, in 20-30 cm 171,7 µg/kg Tetrazyklin detektiert werden. Die Gehalte von Chlortetrazyklin lagen in allen oberen Schichten zwischen 4,6 und 7,3 µg/kg. In 30 bis 90 cm Tiefe und im Grundwasser konnten keine Tetrazykline nachgewiesen werden.

Tabelle 12 gibt eine Übersicht der bisherigen Untersuchungen von Antibiotika in Böden und Sedimenten.

Bisher gibt es keine Höchstmengenregelungen für Antibiotikagehalte in Böden. Um die möglichen Expositionsmengen abzuschätzen, können mit einem Worst-Case Modell mögliche Konzentrationen in Abhängigkeit von Dosierung, Applikationsart, Tierart, Exkretionsraten und Eintragspfaden berechnet werden (Predicted Environmental Soil Concentrations, kurz PEC) (HALLING-SØRENSEN et. al., 2001). Die Autoren gehen hierbei von experimentell bestimmten Halbwertszeiten (pH 8, 10°C) von 30 Tagen für Sulfonamide und 100 Tage für Tetrazykline aus. Für Sulfadiazin kommen HALLING-SØRENSEN et al. so für Mastschweine auf einen PEC Wert von 4,7 bis 308 µg/kg Boden bei oraler Verabreichung (bis zu drei Behandlungen; Dosierung: 30 mg/kg KG, 3-5 Tage, Exkretion: 0.9). Für Chlortetrazyklin liegt dieser Wert bei 155-921 µg/kg Boden (Dosierung: 40 mg/kg KG, 5-7 Tage, Exkretion: 0.65). Details zu den Berechnungen sind bei KÜMMERER (2001) zu entnehmen.

Tabelle 12: Vorkommen von Antibiotika in Böden und Sedimenten

Substanz (Bodentiefe)	Konzentration	Nachweis- grenze *	Land	Referenz
<b>Sedimente</b>				
Oxytetracyclin	0,1-4,9 mg/kg TS	-	N	JACOBSEN&BERGLIND, 1988
	0,05-16 µg/g	0,05	FIN	BJÖRKLUND et al., 1990
<b>Böden</b>				
Chlortetracyclin 0-40 cm	<1-26,4 µg/kg	1,0	D	HAMSCHER et al., 2000a,b
0-30 cm	4,6-7,3 µg/kg	2	D	HAMSCHER et al., 2002
	10-15 µg/kg	0,6-5,6	DK	JAKOBSEN, 2004
Tetracyclin 0-40 cm	<1-32,2, µg/kg	1,0	D	HAMSCHER et al., 2000a,b
0-10 cm	82,2 µg/kg	1	D	HAMSCHER et al., 2002
10-20	198,2 µg/kg	1	D	HAMSCHER et al., 2002
20-30	171,7 µg/kg	1	D	HAMSCHER et al., 2002
Sulfamethazin	15 µg/kg TS	-	D-NW	CHRISTIAN et al., 2003
<b>Abkürzungen:</b>				
<i>D</i>	<i>Deutschland</i>		<i>DK</i>	<i>Dänemark</i>
<i>D-NW</i>	<i>Nordrhein-Westfalen</i>		<i>FIN</i>	<i>Finnland</i>
			<i>N</i>	<i>Norwegen</i>

nach BOXALL et al., 2004

\* gleiche Einheit wie Konzentration

### 4.3 Vorkommen in der aquatischen Umwelt

Eine Kontamination von Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser mit Pharmazeutika konnte in einigen Arbeiten bereits nachgewiesen werden (RICHARDSON & BROWN, 1985; HEBERER & STAN, 1998; HEBERER, 2002; HIRSCH et al., 1999; KÜMMERER, 2001; HAMSCHER et al., 2002a; THIELE-BRUHN, 2003).

Untersuchungen des BAYERISCHEN LANDESAMTES FÜR WASSERWIRTSCHAFT (2004) zeigten nur wenige Einzelbefunde mit Konzentrationen von max. 0,04 µg/l (Trimethoprim und Sulfathiazol). Im Drainagewasser unterhalb eines Schweinemastbetriebes mit Gülleverregnung konnten 0,08 µg/l Sulfamethazin, im nahe gelegenen Bach zusätzlich auch Sulfadiazin mit 0,05 µg/l nachgewiesen werden. Dies deutet auf diffuse Einträge von Arzneimittelwirkstoffen in Oberflächengewässer durch Abschwemmung bzw. Verlagerung ins oberflächennahe Grundwasser hin.

Bei KÜMMERER (2001) werden Antibiotikakonzentrationen bis zu 1 µg/l in Abwässern und bis zu 6 µg/l in Oberflächenwässern angegeben, wobei ein Risiko für den Menschen durch eine Trinkwasserkontamination als vernachlässigbar eingestuft wird.

In Tabelle 13 sind weitere Untersuchungsergebnisse zum Antibiotikavorkommen in der aquatischen Umwelt zusammengestellt.

Tabelle 13: Vorkommen von Antibiotika in Oberflächen- / Grundwasser

Substanz	Konzentration	Nachweisgrenze *	Land	Referenz
<b>Oberflächenwasser</b>				
Chloramphenicol	0,06 ng/l	0,02	D	HIRSCH et al., 1999
Chlortetrazyklin	0,5 ng/l	0,5	USA	MEYER et al., 2000
	ND-690 ng/l	50-100	USA	KOLPIN et al., 2002
Doxyzyklin	ND	100	USA	KOLPIN et al., 2002
Enrofloxacin	ND	20	USA	KOLPIN et al., 2002
Oxytetrazyklin	ND-340 ng/l	100	USA	KOLPIN et al., 2002
Sulfamethoxazol	ND-100 ng/l	10	NL	STOLKER et al., 2004
Sulfachloropyridazin	ND	50	USA	KOLPIN et al., 2002
Sulfadimethoxin	ND-60 ng/l	50	USA	KOLPIN et al., 2002
	0,24-15 µg/l	-	USA	LINDSEY et al., 2001
Tetrazyklin	ND-110 ng/l	50-100	USA	KOLPIN et al., 2002
Trimethoprim	ND-710 ng/l	14-30	USA	KOLPIN et al., 2002
<b>Hospitalabwässer</b>				
Gentamicin	0,4-7,6 µg/l	0,2	D	LÖFFLER & Ternes., 2003
<b>Grundwasser</b>				
Chlortetrazyklin	0,17-0,22 µg/l	0,1-0,3	D	HAMSCHER et al., 2000a
Oxytetrazyklin	0,15-0,19 µg/l	0,1-0,3	D	HAMSCHER et al., 2000a
Sulfamethazin	0,08-0,16 µg/l	0,02 (BG)	D	HIRSCH et al., 1999
Sulfamethoxazol	410 ng/l	6,2	D-BW	SACHER et al., 2001
Tetrazyklin	0,11-0,27 µg/l	0,1-0,3	D	HAMSCHER et al., 2000a

-----  
**Abkürzungen:**

<i>D</i>	<i>Deutschland</i>	<i>NL</i>	<i>Niederlande</i>
<i>D-BW</i>	<i>Baden-Württemberg</i>	<i>ND</i>	<i>not detected</i>

nach BOXALL et al., 2004

\* gleiche Einheit wie Konzentration

#### 4.4 Abbau von Antibiotika in Gülle und Böden

Im Übersichtsartikel von BOXALL et al. (2004) wurden zahlreiche Untersuchungen zum Vorkommen von Antibiotika in den Umweltkompartimenten und deren Abbaupotenzial in Boden und Gülle zusammengestellt (Tabelle 14). So sind Tetrazykline, die nur wenig oder gar nicht metabolisiert werden, in den Umweltmedien sehr persistent. Für die Sulfonamide geben BOXALL et al. (2003, 2004) Halbwertszeiten von ca. 30 Tagen an.

Tabelle 14: Abbau von Antibiotika in Boden/Gülle

Verbindung	Testmatrix	Halbwertszeit bzw. Abbau in angegebener Zeit	Besonderheit	Referenz
Chlor-tetrazyklin	Boden und Geflügelgülle	44% nach 30 d	30°C	GAVALCHIN & KATZ, 1994
	Boden und Geflügelgülle	Kein Abbau nach 30 d	20°C	GAVALCHIN & KATZ, 1994
Oxy-tetrazyklin	Sediment	< 45 d	aerob	LAI et al., 1995
	Sediment	Kein Abbau nach 70 d	anaerob	LAI et al., 1995
	Gülle	30 d	-	DE LIGUORO et al., 2003
Penicillin	Bo-den/Geflügel-mist gemischt	< 3h	-	GAVALCHIN & KATZ, 1994
Sulfachlo-ropyridazin	Legehennen-fäzes	71% nach 3 Monaten	-	BOXALL et al., 2004
	Broilerfäzes	65 % nach 8 d	-	BOXALL et al., 2004
Tylosin	Bo-den/Geflügel-mist gemischt	< 5 d	-	GAVALCHIN & KATZ, 1994
	Schweinegülle	< 2 d	-	LOKE et al., 2000 DE LIGUORO et al., 2003
	Gülle-Bodenmix	3,3-8,1 d	aerob	INGERSLEV et al., 2001a,b
Tetra-zyklin	Schweinegülle Kühlcontainer	53 d	Temperatur unabhängig	GRAFE, 2000 und WINKLER & GRAFE, 2001
	Schweinegülle Freiland	106 d	Temperatur unabhängig	GRAFE, 2000 WINKLER & GRAFE, 2001
	Schweinegülle belüftet	4,5 d	-	KÜHNE et al., 2000
	Schweinegülle unbelüftet	9 d	-	KÜHNE et al., 2000
Chlor-ampheni-col	Flüssigmist unbelüftet	ca. 7 d	-	BERGER et al., 1986
Sulfa-methazin	Gülle	5 Wochen		LANGHAMMER, 1988
	Flüssigmist unbelüftet	ca. 7 d	Rückaktivierung SMT	BERGER et al., 1986

nach BOXALL et al., 2003

Da die Persistenz bestimmter Antibiotika im Boden zum Teil außerordentlich hoch ist, ist es erforderlich zu wissen, in welchem Ausmaß diese unter Praxisbedingungen via Gülle eingetragen werden. Erste Untersuchungen zum Verhalten der Rückstände während der Lagerung oder im Boden zeigten Tendenzen der einzelnen Verbindungen hinsichtlich deren Stabilität. Jedoch fehlen genauere Daten über das Vorkommen der betrachteten Substanzklassen in Feldproben, sowie der hieraus möglicherweise resultierenden Belastung von Boden und Trinkwasser (DAUGHTON & TERNES, 1999; KÜMMERER, 2003; KAY et al., 2004).



## C Material und Methoden

### 1 Material

#### 1.1 Probenmaterial

##### 1.1.1 Standardgülle

Für die Entwicklung und Validierung der Nachweismethoden wurde antibiotikafreie Gülle benötigt. Diese wurde am Institut für Tierernährung der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) in Grub produziert.

Um eine antibiotikahaltige Standardgülle zum Vergleich für die Feldproben zu erhalten, wurde diese bei der metaphylaktischen Behandlung (N=2x6 je Versuch; Lebendgewicht: 15 kg bzw. 70 kg) nach therapeutischer Dosierung von Antibiotika (20 mg CTC/kg LG bzw. 50 mg Antastmon/kg LG) gesammelt. Es wurden zwei der in der landwirtschaftlichen Praxis am häufigsten eingesetzten Wirkstoffe, Chlor-tetrazyklin („CTC 100“ (90% Chlortetrazyklin), belapharm, Vechta) und Sulfadia-zin/Trimethoprim („Antastmon“ (50% Sulfadiazin, 10% Trimethoprim), belapharm, Vechta) ausgewählt.

##### 1.1.2 Gülle des Rückstandsmonitorings

Nach der Entwicklung und Validierung der Analysemethoden sollten in einem bay-erweiten Monitoring Gülle auf die am häufigsten verwendeten und umweltrele-vanten Antibiotika überprüft werden.

#### Durchführung des Monitorings

Das Güllemonitoring wurde nach statistischen Vorgaben des Fachgebietes für Biometrische Methoden in der Tierzucht der TU München im Herbst 2002 durch-geführt. Auf Grundlage der INVECOS-Datei des Instituts für Ländliche Struktur-entwicklung, Betriebswirtschaft und Agrarinformatik der LfL wurde eine repräsen-tative Auswahl von 900 Betrieben per Zufallsgenerator getroffen. Es wurde auf eine gleiche Verteilung der Betriebstypen innerhalb der Regierungsbezirke geach-tet. Zudem wurden die Betriebe der einzelnen Typen in zwei Größenklassen ein-geteilt (Tabelle 15). Die Zufallsstichproben wurden einzeln für jeden Betriebstyp, Größe und Regierungsbezirk gezogen. Die ausgewählten Betriebe wurden in ei-nem zweiten Schritt den Landkreisen und somit den entsprechenden Landwirt-schaftsämtern, die vom Bayerischen Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten (StMLF) vorab informiert wurden, zugeordnet.

Tabelle 15: Größenklassen der Betriebstypen

Betriebstyp	Zucht	Mast	Gemischt
klein	10 - 45 Zuchtsauen	30 - 220 Masttiere	7- 30 Zuchtsauen
groß	> 46 Zuchtsauen	> 221 Masttieren	> 31 Zuchtsauen

Das Güllemonitoring wurde anonym durchgeführt. In einem Anschreiben des Instituts für Agrarökologie, Ökologischer Landbau und Bodenschutz (IAB) der LfL und des Lehrstuhls für Tierhygiene der TU München wurden die Landwirte über die Güllebeprobung und den Hintergrund des Forschungsvorhabens informiert. Hier wurde besonders auf die Anonymisierung hingewiesen. Innerhalb einer Frist von 14 Tagen konnten die Betriebsleiter ohne Angabe von Gründen der Beprobung widersprechen.

Nach diesem Rundbrief gingen 170 Absagen ein, wobei die häufigsten Gründe bei den kleinen Betriebsklassen Haltung auf Festmist (Jaucheanfall) oder Betriebsaufgabe nach der letzten INVECOS-Erhebung waren. Eine Reihe von Betrieben hatte die Gülle bereits ausgefahren oder keine Düngung im Herbst vorgesehen.

Im Oktober 2002 wurden Polyethylen-Probengefäße, Probenbegleitscheine (siehe Anhang) und Hinweise zur Probennahme an 730 Betriebe versandt. Darin wurden die Landwirte gebeten, die Gülle nach dem Aufrühren zum Zeitpunkt des Ausbringens zu entnehmen. Im Probenbegleitschein wurde, um die Anonymisierung zu gewährleisten, lediglich der Landkreis, Betriebstyp und die Größenklasse vermerkt.

Durch die schwierigen Witterungsverhältnisse im Herbst 2002 konnten einige Betriebe keine Gölledüngung vornehmen. Unterrepräsentierte Landkreise wurden deshalb im Frühjahr 2003 erneut beprobt.

Beim Eingang wurden Jaucheproben, Proben mit unzureichend ausgefüllten Begleitscheinen oder Proben aus nicht aufgerührten Gölle ausge sondert. Aliquote der Proben wurden sofort tiefgefroren und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Insgesamt gingen im Rahmen des Monitorings Herbst 2002 / Frühjahr 2003 485 Proben ein. Für die Untersuchung konnten 380 Proben verwendet werden (272 Herbst, 108 Frühjahr). Die geforderte gleiche Verteilung der Betriebstypen wurde erfüllt (Abbildung 12). So standen 132 Proben aus Mastbetrieben, 115 aus Zucht- und 133 aus gemischten Betrieben zur Analyse zur Verfügung. Von den kleineren



Betriebsklassen gingen nur etwa halb so viele Proben ein wie von den großen. Diese kleinen Betriebe verwenden häufig Stroh als Einstreu, so dass nur Jauche anfiel, die im Rahmen dieser Beprobung nicht untersucht werden sollte. Viehreiche Regierungsbezirke (z.B. Niederbayern) waren zahlenmäßig stärker vertreten als Bezirke mit nur wenigen schweinehaltenden Betrieben (Abbildung 13).

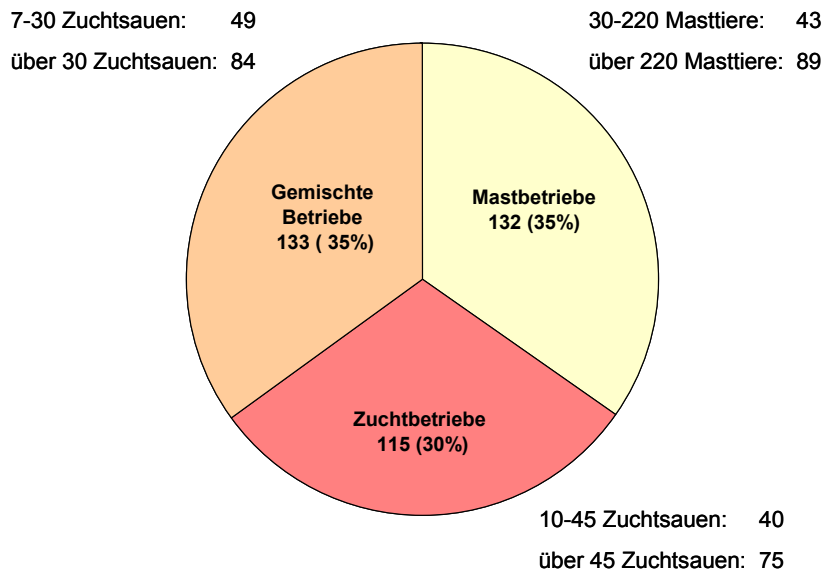


Abbildung 12: Verteilung der Proben auf die Betriebstypen und -größen

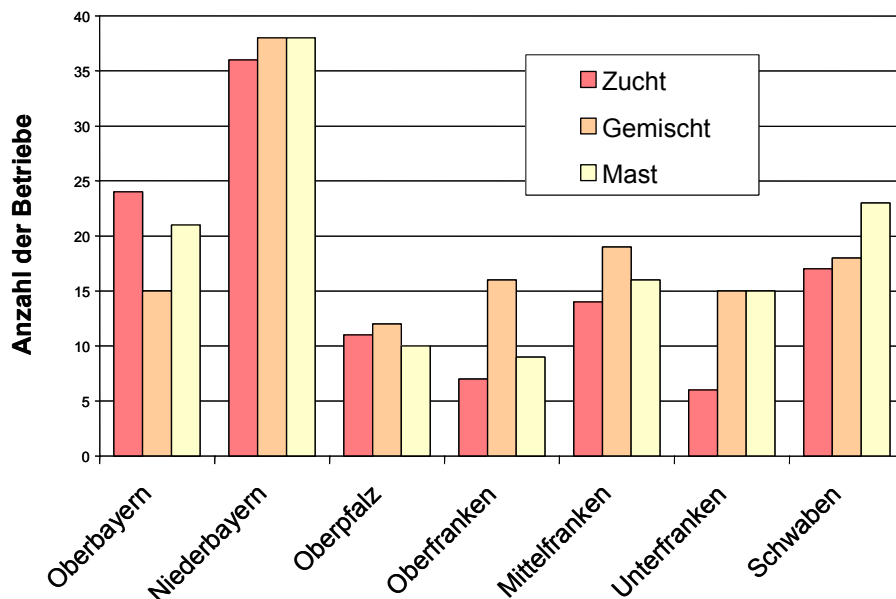


Abbildung 13: Verteilung der Proben auf die Regierungsbezirke

## 1.2 Gebrauchsmaterial

- Analysenwaage PT 1200, SATORIUS; XB 620 C PRECISA
- Lyophilisator Alpha I-5 mit Drehschieber-Vakuum Pumpe RD 4, CHRIST
- Laborschüttler VORTEX Genie 2, SCIENTIFIC INDUSTRIES G-560 E, BENDER&HOBEIN
- Horizontalschüttler KS 250, JANKE&KUNKEL
- Zentrifuge Sepatech Megafuge 1,0 R, HERAEUS
- Vakuumzentrifuge RVC 2-25, CHRIST
- Membran-Vakuumpumpe MZ 2 C, VACUUBRAND
- Kühlfalle CT 04-50, CHRIST
- Vakuumextraktionsanlage J.T. BAKER
- Luer Absperrhähne Nr. 19836, MERCK
- Stickstoffevaporator Vapotherm mobil FN 4578, BARKEY
  
- HPLC-Pumpe 2690 mit Autosampler und Degasser, WATERS
- Säulen Xterra, RP C<sub>18</sub>, 2,1x150mm, 3,5 µm, WATERS  
 Atlantis RP C<sub>18</sub>, 2,1x150mm, 3,0 µm, WATERS  
 Sunfire RP C<sub>18</sub>, 2,1x150mm, 3,5 µm, WATERS  
 Luna RP C<sub>8</sub>, 2,0x150mm, 3,0 µm, PHENOMENEX  
 Synergi RP C<sub>18</sub>, 3,0x210mm,3,0 µm, PHENOMENEX  
 Gemini RP C<sub>18</sub>, 3,5x150mm, 3,5 µm, PHENOMENEX
  
- Massenspektrometer VG Platform II, FISIONS INSTRUMENTS

## 1.3 Verbrauchsmaterial

- PP-Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml steril, GREINER
- Glasfasermikrofilter GF A, 90 mm ø, WHATMAN
- Festphasenkartuschen Strata C<sub>18</sub>, 100mg/1ml, 8B-2001-EAK, PHENOMENEX  
 Strata C<sub>8</sub>, 8B-2005-EAK, 100 mg/1ml, PHENOMENEX  
 StrataX 30 mg/1ml, 8B-S100-TAK, PHENOMENEX  
 Strong-Anion-Exchange (SAX)-Säulen, 100 mg/1ml, PHENOMENEX
- HPLC-Fläschchen Crimp-Top Vial mit Crimp-Cap und Septum, BGB

### 1.3.1 Chemikalien

- Methanol HPLC-grade, BAKER
- Acetonitril HPLC-grade, BAKER
- Hexan VWR
- Ethylacetat p.a. grade, BAKER
- Phosphatpuffer (PBS) L182-50, BIOCHROM
- Tertbutylmethylester (TBME) 293210, SIGMA
- Citronensäuremonohydrat 6346, MERCK
- Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat 6586, MERCK
- Ethylenediaminetetraaceticacid (EDTA) E 4884, SIGMA
- Ameisensäure 98 - 100%, MERCK
- Reinstwasser Milli-QUF Plus, MILLIPORE

### 1.3.2 Standardsubstanzen

Tetrazykline:

- Tetrazyklin-Hydrochlorid 87130, FLUKA
- 4-Epi-Tetrazyklin-Hydrochlorid 37918-100 Vetranal<sup>®</sup>, RIEDEL-DE HAEN
- 4-Epi-Anhydro-Tetrazyklin-Hydrochlorid 23311-1000, ACROS
- Chlortetrazyklin-Hydrochlorid 268245000, ACROS
- 6-Iso-Chlortetrazyklin-Hydrochlorid 268211000, ACROS
- 4-Epi-Chlortetrazyklin-Hydrochlorid 268231000, ACROS
- 4-Epi-Anhydro-Chlortetrazyklin-Hydrochlorid 268221000, ACROS
- Oxytetrazyklin-Hydrochlorid 46598, RIEDEL-DE HAEN
- Doxyzyklin-Hydrochlorid 44577, FLUKA

Sulfonamide:

- Sulfadiazin S-8626, SIGMA
- Sulfamerazin S-8876, SIGMA
- Sulfamethazin S-6256, SIGMA
- Sulfadimethoxin S-7007, SIGMA
- Sulfamethoxazol S-7507, SIGMA
- Sulfathiazol S-9876, SIGMA
- Sulfaguanidin S-8751, SIGMA
- Sulfaphenazol S-0758, SIGMA
- N4-acyl-N1(4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl)sulfonamid S-010236, SIGMA

- Sulfachloropyridazin 46834, Vetranal<sup>®</sup>, RIEDEL-DE HAEN
- Sulfamethoxyypyrazin 46859, Vetranal<sup>®</sup>, RIEDEL-DE HAEN
- Sulfameter 46834, Vetranal<sup>®</sup>, RIEDEL-DE HAEN
- Sulfadoxin 46810, Vetranal<sup>®</sup>, RIEDEL-DE HAEN
- Sulfisomedin 46908, Vetranal<sup>®</sup>, RIEDEL-DE HAEN
- Sulfapyridin 46890, Vetranal<sup>®</sup>, RIEDEL-DE HAEN

#### N4-Acetyl-Metaboliten der Sulfonamide

Da lediglich der N4-Acetyl-Metabolit von Sulfamethazin kommerziell erhältlich war, wurden weitere Sulfonamidmetaboliten (Sulfadiazin, Sulfamerazin, Sulfathiazol) nach der Methode von PFEIFER et al. (2002) synthetisiert. Die Methode befindet sich im Anhang.

#### Weitere Antibiotika

- Enrofloxacin 17849, FLUKA
- Florfenicol F-1427, SIGMA
- Tiamulinfumarat 46959, Vetranal<sup>®</sup>, RIEDEL-DE HAEN
- Trimethoprim T-7883, SIGMA

### 1.3.3 Weitere Lösungen

(nach MERCK Tabelle S. 69 ff.)

#### Citratpuffer 1 (Merck Tabelle Nr. 2 mit pH-Werten 4,0; 4,7; 5,0)

Teile A: Dinatriumcitrat 0,1 mol/l

[800 ml Citronensäuremonohydrat (21,014 g/l) + 200 ml NaOH  
1 mol/l]

Teile B: HCl 0,1 mol/l

Zusammensetzung der Pufferlösung: x Teile A + (100-x) Teile B

z.B. pH 4,0: x = 55,1 ml auf 100 ml

#### Citratpuffer 2: (pH 4,0; 4,7; 5,0)

192 g Citronensäuremonohydrat in 800 ml Reinstwasser lösen und mit Natriumhydroxid auf gewünschten pH-Wert einstellen (Wärmeentwicklung beachten, Puffer zwischenkühlen).

Sörensenpuffer: (Merck Tabelle Nr. 10 mit pH-Werten 5,0; 6,0; 6,5)

Teile A: Citronensäuremonohydrat 21,014 g/l

Teile B: Dinatriumhydrogenphosphat 0,2 mol/l ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ : 35,6 g/l)

Zusammensetzung der Pufferlösung: x Teile A+ (100-x) Teile B

z.B. pH 7: x = 19,0 ml auf 100 ml

EDTA-haltige Spüllösung (nach SEZENSNY, 2001):

7,4 g EDTA in 1 Liter Methanol suspendieren (ca. 3 Std. rühren)

## 2 Methoden

### 2.1 Trockensubstanzbestimmungen

Von den Proben des Güllemonitorings wurden 50 bis 100 g Gülle abgewogen, im Trockenschrank bei 118°C bis zur vollständigen Trockne eingeengt und anschließend rückgewogen. Der Trockensubstanzgehalt wurde aus der Differenz von Frisch- zu Trockenmasse berechnet.

### 2.2 Methodenentwicklung

Die Methodenentwicklung war danach ausgerichtet, mit wenigen, möglichst verlustarmen und robusten Methoden die wichtigsten Substanzen simultan zu erfassen.

Der prinzipielle Aufbau der Methoden gliedert sich in Probenvorbereitung, Extraktion, Aufreinigungsverfahren und Analyse.

Gülle als ein Gemisch aus Kot und Harn zeichnet sich durch viele, sehr variable Materialeigenschaften aus. So spiegelt sich in diesem Produkt unter anderem der Einfluss von Fütterung (Inhaltsstoffe, pH-Wert, Trockensubstanzgehalt) und Stallmanagement (Reinigungsverfahren, -häufigkeit) wider. Diese sehr unterschiedlichen Einflüsse müssen bei der Analyse berücksichtigt werden und die gewählten Methoden diesen gegenüber soweit möglich robust sein. In Vorversuchen wurden die einzelnen Analyseschritte modifiziert, um geeignete Verfahren zu entwickeln (Übersicht siehe Abbildung 14).

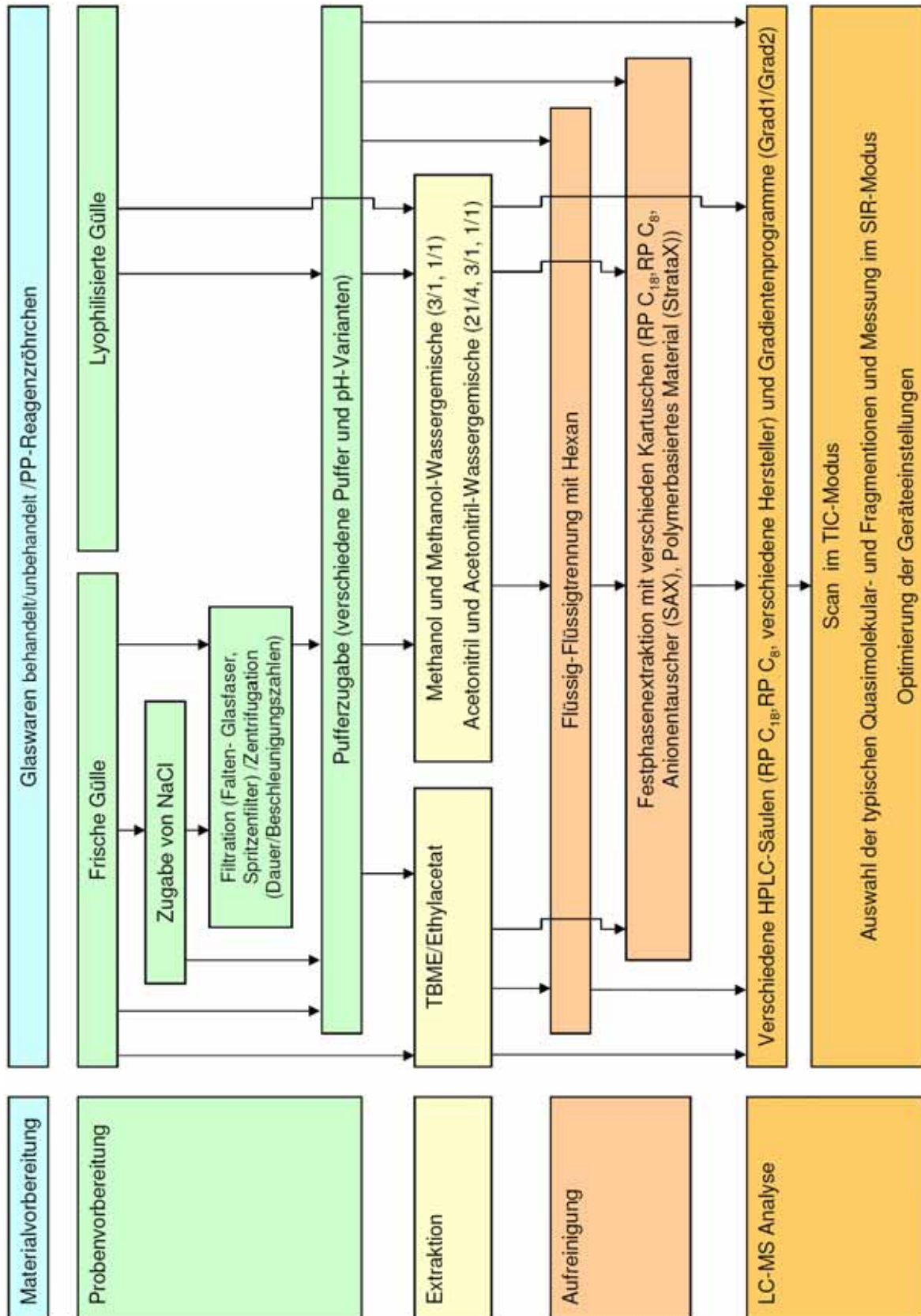


Abbildung 14: Übersicht der Methodenfindung

### 2.2.1 Probenvorbereitung

#### Einflussfaktor pH

Auf Grund der unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der zu detektierenden Substanzen wurden verschiedene Puffer getestet. Da Gülle sich durch eine sehr große Streuung der Materialeigenschaften (Trockensubstanzgehalt, pH Wert) auszeichnet, wurden unterschiedliche pH-Werte sowie eingesetzte Puffermengen überprüft. Auch eine pH-Wert Einstellung der Gülle mittels Natronlauge oder Salzsäure wurde durchgeführt. Der pH-Wert von 50 Gällen wurde gemessen und die Pufferwirkung durch entsprechende Mengenvariation untersucht. Als Puffer wurden Phosphatpuffer und Citratpuffer in pH Bereichen von 4 bis 8 überprüft. Anzustreben war ein pH Bereich, der eine optimale Extraktion der jeweiligen Antibiotika gewährleisten sollte. So wurden zwei Analysegruppen gebildet: Sauer (u.a. Tetrazykline) und neutral/basisch (v.a. Sulfonamide).

#### Einflussfaktor TS

Da auch der Trockensubstanzgehalt einen sehr variablen Faktor bei Gällen darstellt, wurde er von jeder Probe bestimmt (siehe 2.1). Zudem wurde der Einfluss eines Zentrifugationsschrittes als Grobreinigung vor der Extraktion überprüft.

#### Antibiotikaspezifische Einflussfaktoren

Einige Analyten – wie z.B. die Tetrazykline – zeichnen sich durch eine hohe Komplexbildung mit zwei- oder mehrwertigen Kationen aus. Es wurde daher überprüft, ob die eingesetzten Labormaterialien (z.B. Glaswaren) die Analyse beeinflussen können. Dazu wurden zum einen Kunststoffreaktionsgefäße, zum anderen mit methanolischer EDTA-Lösung gespülte Glaswaren verwendet.

### 2.2.2 Extraktion

Als Extraktionsmittel wurden verschiedene Lösungsmittel getestet. Für Vorversuche wurde artifiziell kontaminierte Gülle zum einen frisch, zum anderen lyophilisiert verwendet (Tabelle 16). Auch eine mögliche Verbesserung der Extraktionsrate durch Wiederholung des Extraktionsvorganges (1 bis 4-mal) wurde überprüft.

Tabelle 16: Getestete Extraktionsmittel für frische und lyophilisierte Gülle

Extraktionsmittel	Frische Gülle	Lyophilisierte Gülle
TBME	X	
Ethylacetat	X	
Citratpuffer (pH 4 bis 6)		X
Methanol	X	X
Acetonitril	X	X
Methanol/Wasser (3/1), (1/1)	X	X
Acetonitril/Wasser (2/1), (1/1), (3/1)	X	X

### 2.2.3 Aufreinigungsverfahren

#### Abtrennung von Grobbestandteilen

Nach der Extraktion war eine Aufreinigung zur Separierung von größeren Verunreinigungen bzw. zur besseren Phasentrennung bei Flüssig-Flüssigextrakten nötig. Hierbei wurde die Dauer und Beschleunigungszahlen der Zentrifugationsvorgänge variiert. Auch eine Aufreinigung mittels Filtration (Faltenfilter, Glasfaserfilter, Spritzenfilter 0,3 und 0,45 µm) wurde getestet.

#### Abtrennung von gelösten Bestandteilen

Da Gülle einen großen Anteil an lipophilen Bestandteilen besitzt, welche die Analyse erheblich stören können, wurden Versuche zur Flüssig-Flüssigtrennung mit Hexan durchgeführt. Um etwaige Verluste durch diesen Aufreinigungsschritt quantitativ zu erfassen, wurde der Rohextrakt entweder direkt mittels Festphasenextraktion aufgereinigt, oder zuvor der Flüssig-Flüssigtrennung unterzogen. Bei der Festphasenextraktion wurden zudem verschiedene Säulenmaterialien (RP C<sub>18</sub>, RP C<sub>8</sub>, Anionenaustauscher (SAX), Polymerbasiertes Material (StrataX)) getestet.



## 2.2.4 LC-MS Analysenoptimierung

### Auftrennung in der HPLC

Bei der Auftrennung der Analyten in der HPLC wurden für alle untersuchten Verbindungen verschiedene Säulen (RP C<sub>18</sub> XTerra, Atlantis, Sunfire, Synergie, Gemini, RP C<sub>8</sub> Luna) sowie Gradientenprogramme (siehe Tabelle 17 und Tabelle 18) überprüft, um eine möglichst gute Bestimmbarkeit der zu detektierenden Substanzen zu gewährleisten. Die mobile Phase A bestand aus Acetonitril, Phase B aus Reinstwasser und bei Phase C wurde dem Reinstwasser 5% Ameisensäure hinzugefügt. Für die Säulentemperatur wurden 30°C gewählt, das Injektionsvolumen betrug 5 µl.

Tabelle 17: Gradientenprogramm 1 (Grad1)

Zeit [min]	Anteil A	Anteil B	Anteil C	Flussrate
	[% der mobilen Phase]			[ml/min]
0	8	82	10	0,2
2	8	82	10	0,2
12	50*	40	10	0,2
17	50	40	10	0,2
20	90	0	10	0,5
24	8	82	10	0,5

\* linearer Anstieg

Tabelle 18: Gradientenprogramm 2 (Grad2)

Zeit [min]	Anteil A	Anteil B	Anteil C	Flussrate
	[% der mobilen Phase]			[ml/min]
0	20	70	10	0,2
2	20	70	10	0,2
18	80*	10	10	0,2
20	80	10	10	0,2
22	90	0	10	0,4
28	20	70	10	0,4

\* linearer Anstieg

### Detektion durch die Massenspektrometrie

Die Ionisierung der Moleküle in der Ionenquelle erfolgte mittels Elektrospray (ESP+). Zur Identifizierung und Quantifizierung der Analyten wurden geeignete Quasimolekular- und Fragmentationen im TIC-Modus (Total Ion Current) bei der Analyse der Standardsubstanzen ausgewählt. In einem weiteren Schritt wurden im Single Ion Recording Modus (SIR) die verschiedenen Geräteeinstellungen (u.a. Cone Voltage) optimiert.

Zur Quantifizierung wurde die Signalintensität des Quasimolekülions ( $m/z$ ) der Probe mit der eines externen Antibiotikumstandards verglichen.

## **2.3 Hauptversuche**

### **2.3.1 Nachweisverfahren für Antibiotika in Gülle**

Aufgrund der in den Vorversuchen gewonnenen Erkenntnisse wurden die im Folgenden beschriebenen Methoden entwickelt.

#### Methode zum Nachweis von Tetrazyklinen

##### Probenvorbereitung

Homogenisierte Gülle (1 g Frischmasse) wurde mit 1 ml Puffer (pH 4,7) versetzt und für 30 Sekunden auf dem Laborschüttler (Vortex) intensiv vermischt.

##### Extraktion

Anschließend wurden 6 ml Ethylacetat hinzugefügt und wiederum vermischt (30 s, Vortex). Nach einem 30-minütigen Schütteln auf dem Horizontalschüttler wurden die Proben bei 6200 g für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend 15 Minuten bei  $-70^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Die danach noch flüssige Ethylacetatphase wurde in ein PE-Zentrifugenröhrchen dekantiert und bei  $40^{\circ}\text{C}$  (60 min) in einer Vakuumzentrifuge eingengt. Das verbleibende Puffer-Gülle Gemisch wurde aufgetaut, erneut mit 6 ml Ethylacetat versetzt und somit der Extraktionsvorgang wiederholt. Der zweite Extrakt wurde mit dem Rückstand des ersten vereinigt, bis zur Trockne eingengt (70 min,  $40^{\circ}\text{C}$ ) und in 300  $\mu\text{l}$  Methanol/Reinstwasser (2/1) resolviert.

##### Aufreinigung

Als erster Aufreinigungsschritt erfolgte eine Flüssig-Flüssigtrennung mit Hexan. Hierbei wurden zum Rohextrakt 1 ml Hexan zugegeben, diese Emulsion intensiv vermischt (30 s, Vortex) und anschließend bei 1600 g für drei Minuten zentrifu-

giert. Die Hexanphase wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Nach Zugabe eines weiteren Milliliters Hexan wurde der Vorgang wiederholt. Der verbleibende Hexanrest auf dem Extrakt wurde in der Vakuumzentrifuge (40°C, 3 min) entfernt. Dem in 300 µl Methanol/Reinstwasser (2/1) gelösten Extrakt wurden 1,7 ml Reinstwasser zugefügt, resultierend in einem Gesamtvolumen von 2 ml (0,5 geq/ml).

Bei der folgenden Festphasenextraktion wurden die Kartuschen (StrataX) zuerst mit 1 ml Methanol konditioniert und 1 ml Reinstwasser equilibriert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Säulen zu keinem Zeitpunkt trockenliefen. Anschließend wurde 1 ml des Extraktes aufgetragen (= 0,5 geq). Zum Waschen der Säule wurde 1 ml eines Methanol/Reinstwasser-Gemisches (5/95) verwendet. Anschließend wurde die Säule unter Vakuum für 20 Sekunden trockengezogen. Die Elution erfolgte mit 1 ml reinem Methanol. Das Eluat wurde in der Vakuumzentrifuge auf 200 µl eingengt (40°C, 35 min), in ein HPLC-Fläschchen (gespült mit einer methanolischen EDTA-Lösung) überführt, unter einem sanften Stickstoffstrom evaporiert, anschließend in 200 µl mobiler Phase (Acetonitril/Reinstwasser, 1/1) gelöst und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

#### LC-MS Analyse

Als Säule wurde eine RP C<sub>8</sub>-Säule (Luna, PHENOMENEX), als Gradientenprogramm ein Acetonitril/Reinstwasser-Gemisch (Tabelle 17) verwendet.

Die Identifikation der Tetrazykline erfolgte durch die relative Signalintensität der aufgezeichneten Quasimolekular- und Fragmentionen (m/z) sowie der Retentionszeit. Die Quantifizierung erfolgte durch den Vergleich der Signalintensität mit einem externen Standard.

#### Methode von Sulfonamiden, Trimethoprim, Enrofloxacin, Tiamulin und Florfenicol

##### Probenvorbereitung und Extraktion

Homogenisierte Gülle (1 g) wurde mit 3 ml Sörensenpuffer (pH 7) versetzt und für 30 Sekunden auf dem Laborschüttler (Vortex) intensiv vermischt. Anschließend wurden 10 ml Ethylacetat hinzugefügt und wiederum vermischt (30 s, Vortex). Nach einem 30-minütigem Schütteln auf dem Laborschüttler wurden die Proben bei 6200 g für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend bei -70°C tiefgefroren. Die danach noch flüssige Ethylacetatphase wurde in ein Reagenzglas dekantiert und bei 40°C für 60 Minuten eingengt. Das verbleibende Puffer-Gülle Gemisch wurde aufgetaut, erneut mit 10 ml Ethylacetat versetzt und somit der Extraktionsvorgang wiederholt. Der zweite Extrakt wurde mit dem verbliebenen Rückstand

des ersten vereinigt, bis zur Trockne eingeengt (40°C, 70 min) und in 300 µl Methanol/Reinstwasser (2/1) wieder aufgenommen.

#### Aufreinigung

Als erster Aufreinigungsschritt erfolgte eine Flüssig-Flüssigtrennung mit Hexan. Hierbei wurden dem Extrakt 1 ml Hexan zugegeben, diese Emulsion intensiv vermischt (30 s, Vortex) und anschließend bei 1600 g für drei Minuten zentrifugiert. Die Hexanphase wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Nach Zugabe von 1 ml Hexan wurde der Vorgang wiederholt. Der verbleibende Hexanrest auf dem Extrakt wurde in der Vakuumzentrifuge (40°C, 3 min) entfernt. Der Lösung wurden anschließend 1,7 ml Reinstwasser zugefügt, resultierend in einem Gesamtvolumen von 2 ml (0,5 geq/ml).

Bei der Festphasenextraktion mit Säulen (StrataX) wurden die zuerst mit 1 ml Methanol konditioniert und 1 ml Reinstwasser equilibriert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die stationäre Phase jederzeit mit Lösungsmittel bedeckt war. Anschließend wurde 1 ml des Extraktes aufgetragen (0,5 geq). Zum Waschen wurde nun 1 ml eines Methanol/Reinstwasser-Gemisches (5/95) verwendet und die Säule anschließend unter Vakuum für 20 Sekunden getrocknet. Die Elution erfolgte mit 1 ml Methanol. Das Eluat wurde in der Vakuumzentrifuge auf 200 µl eingeengt (40°C, 35 min), in ein HPLC-Fläschchen (nicht mit methanolischer EDTA-Lösung gespült) überführt, unter einem sanften Stickstoffstrom evaporiert, anschließend in 200 µl mobiler Phase (Acetonitril/Reinstwasser, 1/1) gelöst und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

#### LC-MS Analyse

Es wurde hierbei eine RP C<sub>18</sub>-Säule (Atlantis, WATERS) mit einer mobilen Phase aus Acetonitril und Reinstwasser (Gradient siehe Tabelle 18) verwendet.

Die Identifikation dieser Substanzen erfolgte anhand des für das jeweilige Antibiotikum typischen Quasimolekularions und der spezifischen Retentionszeit. Diese ist abhängig vom Säulenmaterial und vom verwendeten Fließmittel bzw. Gradientenprogramm. Fragmentationen wurden bei der Messung der Sulfonamide auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit der einzelnen Verbindungen nur zur Bestätigung der positiven Befunde aufgezeichnet.

### **2.3.2 Methodenvalidierung**

Zur Validierung wurden die Methoden durch die Analyse von in abgestuften Konzentrationen (5; 0,5; 0,1 und 0,05 mg/kg) artifiziell kontaminierten Proben mit fünf-facher Wiederholung überprüft. Im Einzelnen wurden folgende Antibiotika in die Untersuchung einbezogen: Tetrazyklin, Chlortetrazyklin, Oxytetrazyklin, Doxzyklin, Sulfadiazin, -methazin, -thiazol, -methoxazol, -guanidin, -merazin, -dimethoxin, -chloropyridazin, -methoxyprazin, -meter, -doxin, -phenazol, -isomedin, -pyridin, N4-Acetyl-Sulfamethazin, Trimethoprim, Enrofloxacin, Florfenicol und Tiamulin.

## **2.4 Versuche zur Stabilität von Antibiotika (Lagerungsversuche)**

### **2.4.1 Laborversuche**

Um die Stabilität von Tetrazyklinen und Sulfonamiden während der Lagerung zu untersuchen, wurden im Laborversuch wirkstoffhaltige Gülle über einen Zeitraum von 6 Monaten bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert. So wurden Aliquote (jeweils  $n = 5$ ) bei Raumtemperatur, im Kühlschrank ( $7^{\circ}\text{C}$ ), im Gefrierschrank ( $-20^{\circ}\text{C}$  und  $-70^{\circ}\text{C}$ ), sowie lyophilisierte Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und zu mehreren Zeitpunkten untersucht (0, 1, 3 Tage; 1, 2, 3, 4 Wochen; 3, 6 Monate).

### **2.4.2 Lagerungsversuch mit dotierter und natürlich kontaminierter Gülle**

Um einen möglichen Unterschied im Abbauverhalten zwischen artifiziell kontaminierter und „natürlicher“, durch Behandlungen der Tiere hergestellter, wirkstoffhaltiger Gülle zu überprüfen, wurde im Parallelansatz „natürlich produzierte“ Wirkstoffgülle und dotierte Gülle in zwei Konzentrationsstufen (CTC: 98 bzw. 8 mg/kg; SD: 107 bzw. 8 mg/kg TM: 23 bzw. 3 mg/kg) bei  $7^{\circ}\text{C}$  über einen Zeitraum von 26 Wochen gelagert, Aliquote wöchentlich tiefgefroren und nach Abschluss des Versuchszeitraumes analysiert.

## **2.5 Antibiotika-Monitoring in Gülle**

380 Gülleproben, die im Herbst 2002/Frühjahr 2003 gezogen wurden sind, wurden mit den oben genannten Analyseverfahren auf das Vorkommen von Antibiotikarückständen untersucht.



## D Ergebnisse

### 1 Ergebnisse der Trockensubstanzbestimmung

Die Trockensubstanzbestimmung ergab Werte zwischen 0,2% und 17,3%. Der Mittelwert lag bei 3,7%, der Median bei 3,1%. Bei Betrachtung der einzelnen Betriebstypen, ergab sich für die Mastbetriebe ein mittlerer Trockensubstanzgehalt der Gülle von 4,5% (Median 4,0%), für die Zuchtbetriebe von 2,6% (Median 1,9%) und für die gemischten Betriebe ein Gehalt von 4,1% (Median 3,3%) (Abbildung 15).

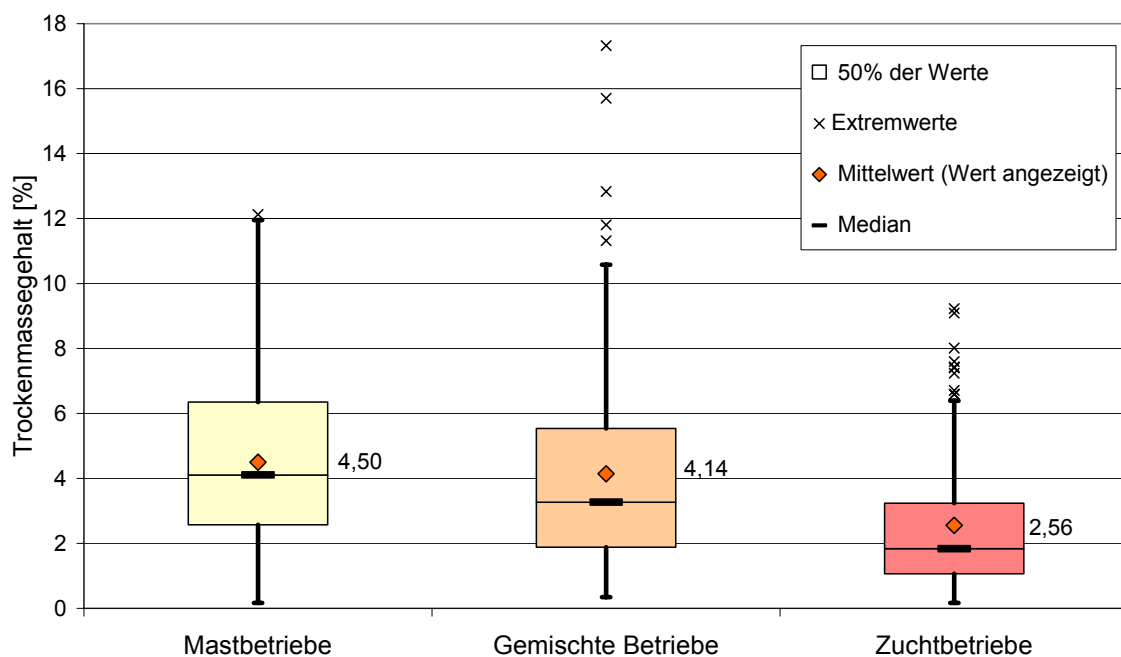


Abbildung 15: Verteilung der Trockenmassegehalte (Boxplot) von Gülle aus bayerischen Schweinehaltungen

## 2 Qualitativer Nachweis von Antibiotika mittels LC-MS

### Tetrazykline

Die massenspektrometrische Untersuchungen der Standardlösungen von Tetrazyklin, Chlortetrazyklin, Oxytetrazyklin und Doxyzyklin mittels TIC ergaben substanzspezifische Spektren, die in den folgenden Abbildungen (Abbildung 16, Abbildung 17, Abbildung 18 und Abbildung 19) wiedergegeben sind.

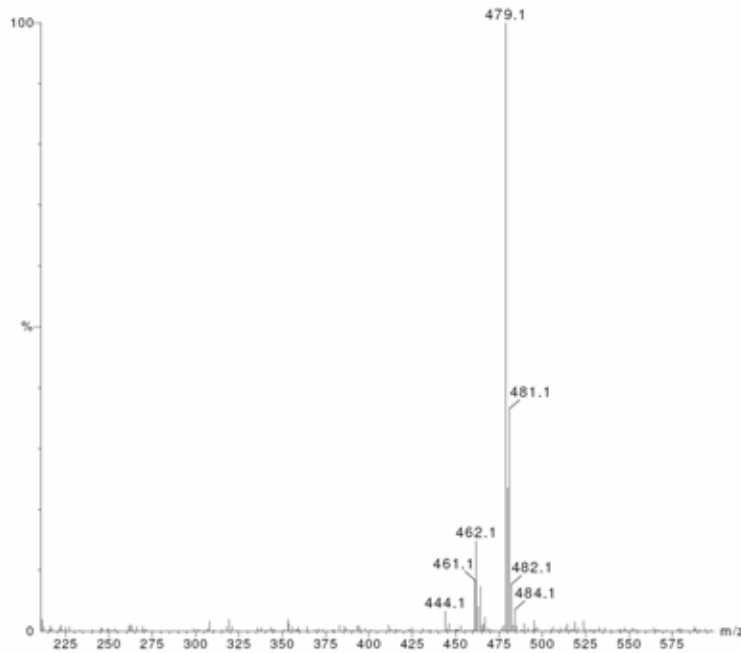


Abbildung 16: Massenspektrum (ESP+) von Chlortetrazyklin (c= 10 µg/ml)

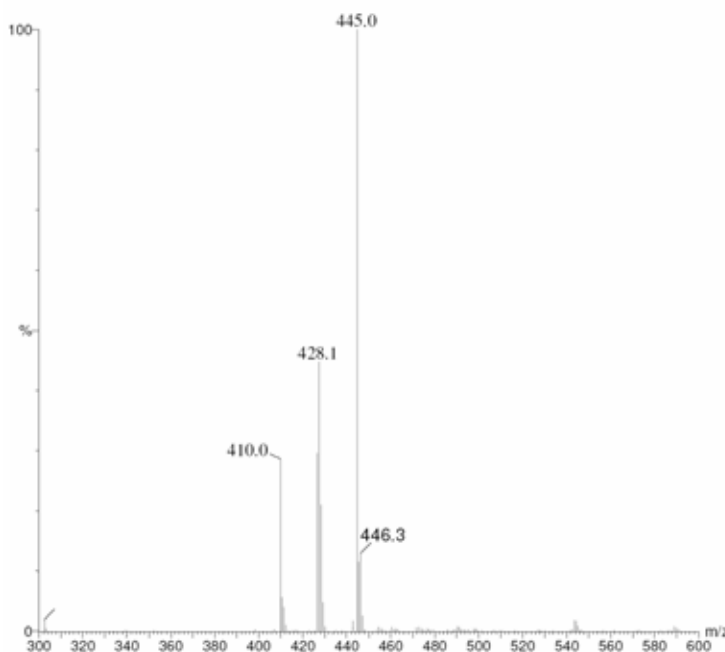


Abbildung 17: Massenspektrum (ESP+) von Tetrazyklin (c= 10 µg/ml)



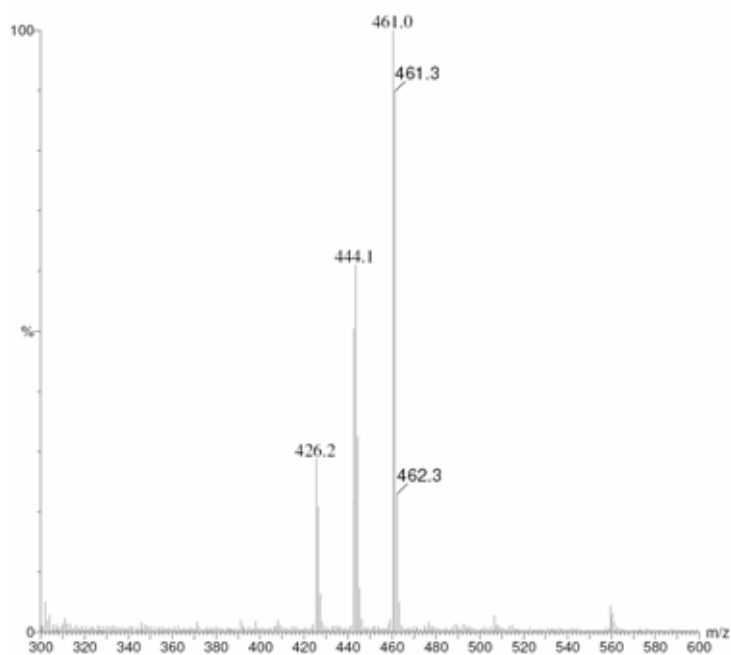


Abbildung 18: Massenspektrum (ESP+) von Oxytetracyclin  
(c= 10 µg/ml)

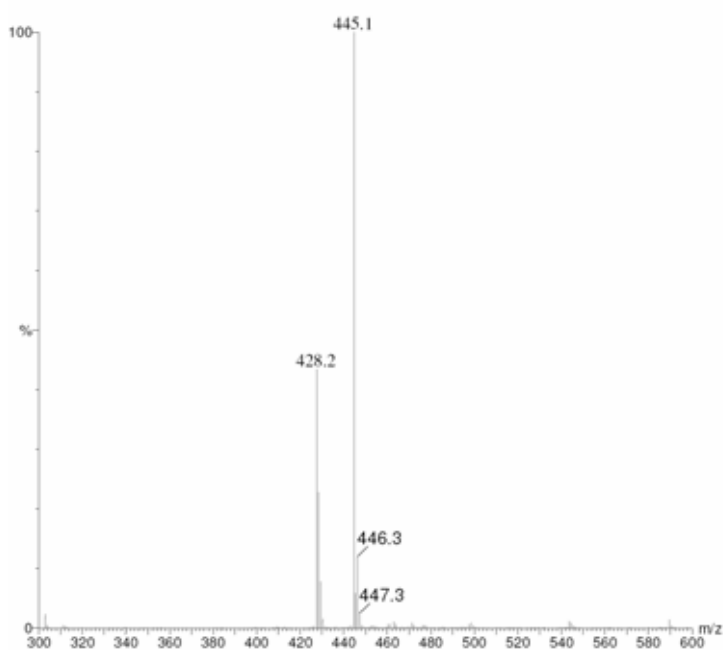


Abbildung 19: Massenspektrum (ESP+) von Doxycyclin  
(c= 10 µg/ml)

Aufgrund dieser Resultate und den substanzspezifischen Retentionszeiten wurde für den Nachweis dieser Verbindungen im SIR-Modus die in Tabelle 19 wiedergegebenen Quasimolekular- und Fragmentionenmassen aufgezeichnet. Für Chlortetrazyklin ergaben sich beispielsweise drei typische Ionenmassen: 479 [m+H], 462 [m+H-NH<sub>3</sub>], 444 [m+H-H<sub>2</sub>O-NH<sub>3</sub>) zur Retentionszeit 13,5 Minuten.

Tabelle 19: Aufgezeichnete Ionenmassen und Retentionszeiten  
(Luna C<sub>8</sub>, Grad1, ESP+)

Substanz	Quasimolekular- und Fragmentionen [m/z]	Retentionszeit [min]
Tetrazyklin	<b>445</b> , 428, 410	10,6
Chlortetrazyklin	<b>479</b> , ,462, 444	13,5
4-Epi-Chlortetrazyklin	<b>479</b> , ,462, 444	12,8
6-Iso-Chlortetrazyklin	<b>479</b> , 462	12,7
Anhydrochlortetrazyklin	<b>461</b> , 444	16,1
Oxytetrazyklin	<b>461</b> , 444, 426	8,0
Doxyzyklin	<b>445</b> , 428	14,5

Die Linearität des Detektors wurde mit Standardlösungen im Bereich zwischen 1 und 1000 ng (entsprechend der absoluten Menge des Minimal- und Maximalgehaltes der Feldproben pro Injektionsvolumen) mit einem Bestimmtheitsmaß von  $r^2=0,998984$  überprüft (hier am Beispiel des Chlortetrazyklin-Standards, Abbildung 20).

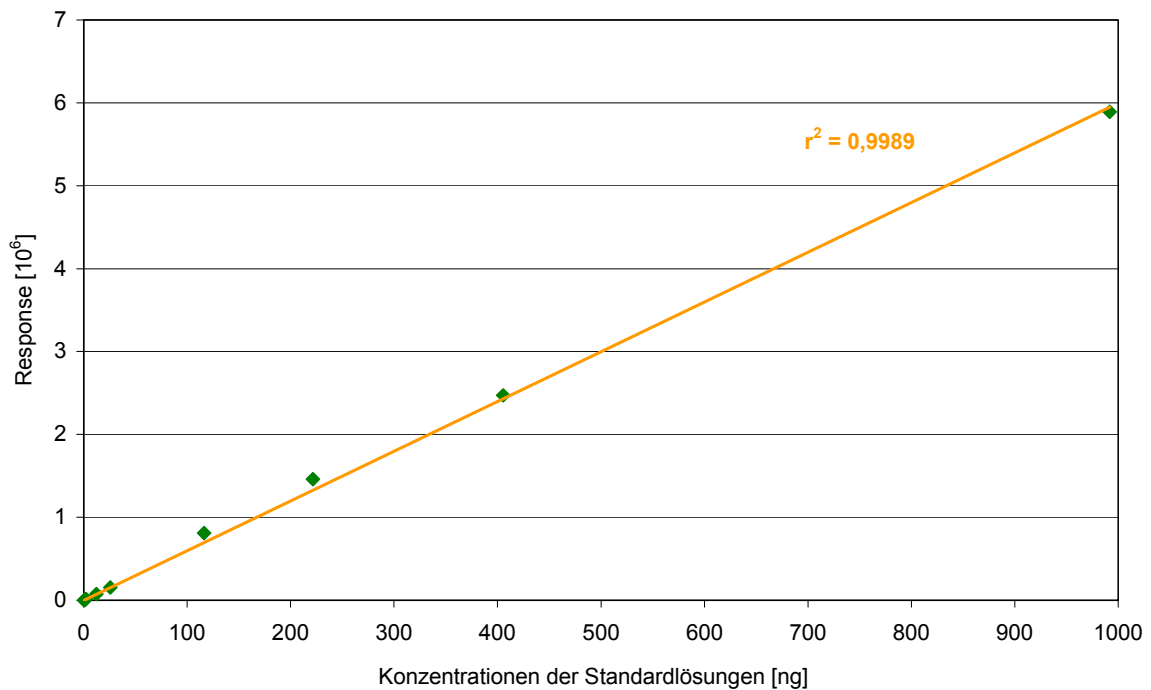


Abbildung 20: Überprüfung der Linearität des Massenspektrometers (hier: CTC-Standardlösungen im absoluten Konzentrationsbereich von 1 bis 1000 ng)

Wie bereits in Kapitel Literatur 3.1.1 beschrieben, kommt es bei Chlortetrazyklin zu Iso-/Epimerisierungen. Abbildung 21 zeigt die Signale des Chlortetrazyklins, 4-Epi-Chlortetrazyklins und des 6-Iso-Chlortetrazyklins. 4-Epi-Chlortetrazyklin und 6-Iso-Chlortetrazyklin konnten unter den gewählten Bedingungen nicht differenziert werden.

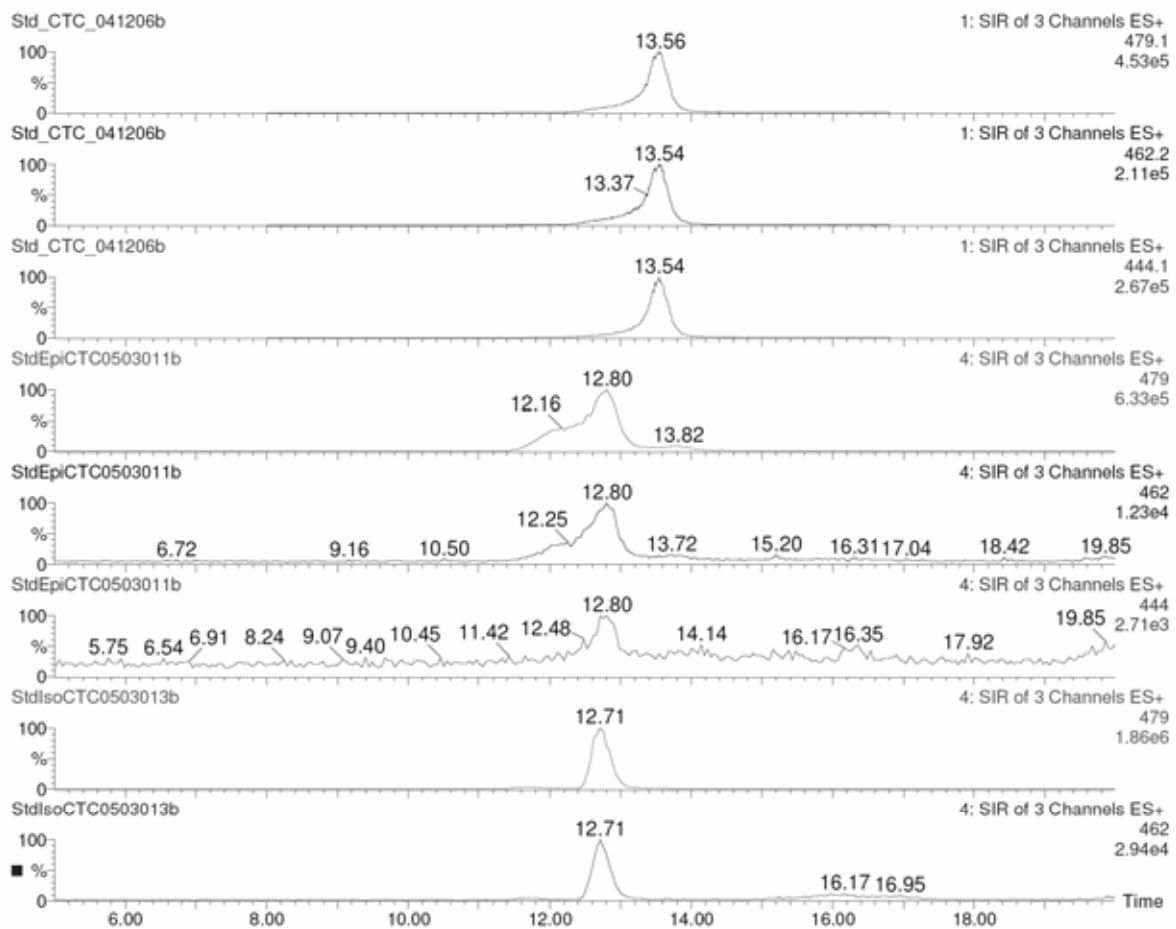


Abbildung 21: Chromatogramme von Standardlösungen ( $c = 10\mu\text{g/ml}$ ) von Chlorotetracyclin, 4-Epi-Chlortetracyclin und 6-Iso-Chlortetracyclin

### Sulfonamide und Trimethoprim

In Abbildung 22 ist ein Spektrum des Scans im TIC-Modus eines Sulfadiazin-Standards exemplarisch für die Gruppe der untersuchten Sulfonamide dargestellt.

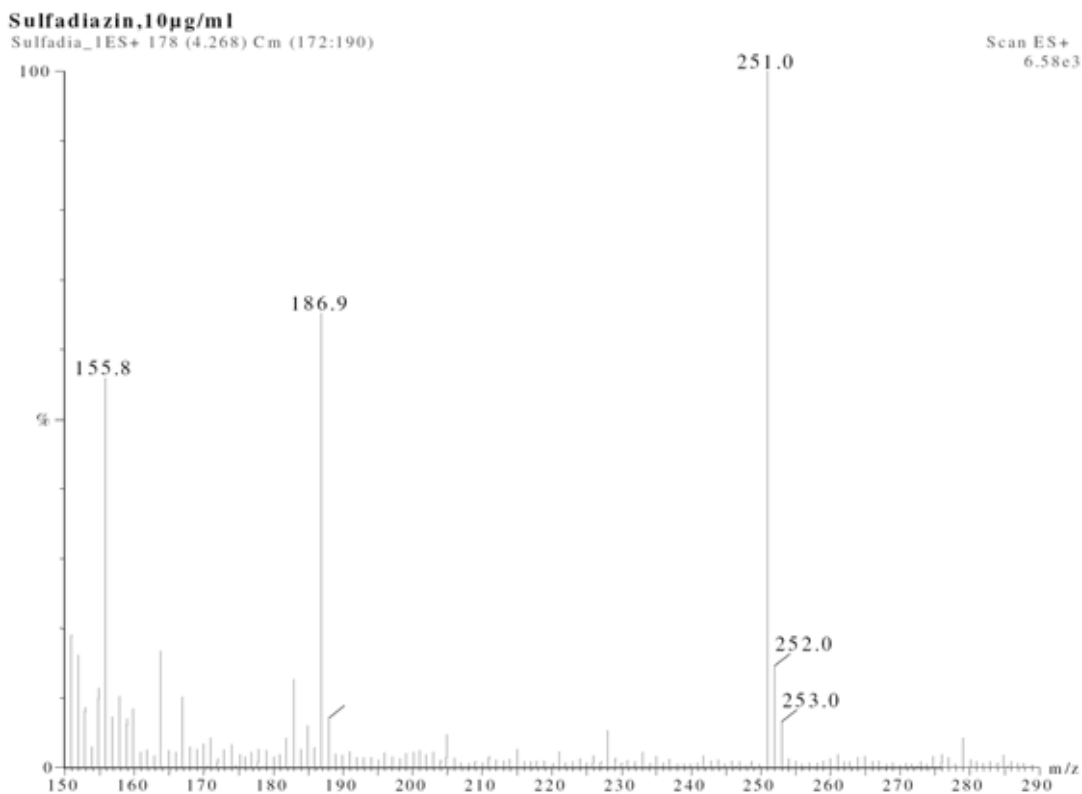


Abbildung 22: Massenspektrum (ESP+) von Sulfadiazin (c= 10 µg/ml)

Bei den massenspektrometrischen Untersuchungen der 15 ausgewählten Sulfonamide wies das jeweilige Quasimolekularion die stärkere Intensität auf. Darüber hinaus fiel bei allen Verbindungen ein Fragment mit der m/z 156 auf. Dieses stellt die Sulfonyl-Gruppe dar, die nach Abspaltung des jeweiligen Restes von der Sulfat-Gruppe entsteht.

Unter Berücksichtigung der jeweiligen Retentionszeiten wurden für die einzelnen Sulfonamide die in Tabelle 20 dargestellten Quasimolekular- und Fragmentationen aufgezeichnet.

Tabelle 20: Aufgezeichnete Quasimolekular- und Fragmentationen und Retentionszeiten der Sulfonamide und Trimethoprim (Atlantis C<sub>18</sub>, Grad1, ESP+)

Substanz	[m/z]	Retentionszeit [min]
Sulfaguanidin	<b>215</b> , 156	4,0
Sulfadiazin	<b>251</b> , 187,156	6,5
Sulfisomedin	<b>279</b> , 156	7,0
Sulfathiazol	<b>256</b> , 156	7,3
Sulfapyridin	<b>250</b> , 156	7,5
Sulfamerazin	<b>265</b> , 172,156	8,5
Sulfamethazin	<b>279</b> , 156,124	9,8
Sulfamethoxypyrazin	<b>281</b> , 156	11,7
Sulfameter	<b>281</b> , 156	12,1
Sulfamethazin-Metabolit	<b>322</b> , 156	13,7
Sulfochloropyridazin	<b>284</b> , 221,156	14,0
Sulfamethoxazol	<b>254</b> , 156	14,9
Sulfadoxin	<b>311</b> , 247,156	15,3
Sulfadimethoxin	<b>311</b> , 156	17,7
Sulfaphenazol	<b>315</b> , 156	18,2
Trimethoprim	<b>291</b> , 261,230	12,3

Florfenicol, Enrofloxacin, Tiamulin

In Abbildung 23 sind die aufgezeichneten Massenspektren von Standardlösungen von Florfenicol, Tiamulin und Enrofloxacin (TIC-Modus) dargestellt. Auch hier weist das jeweilige Quasimolekularion die stärkste Intensität auf.

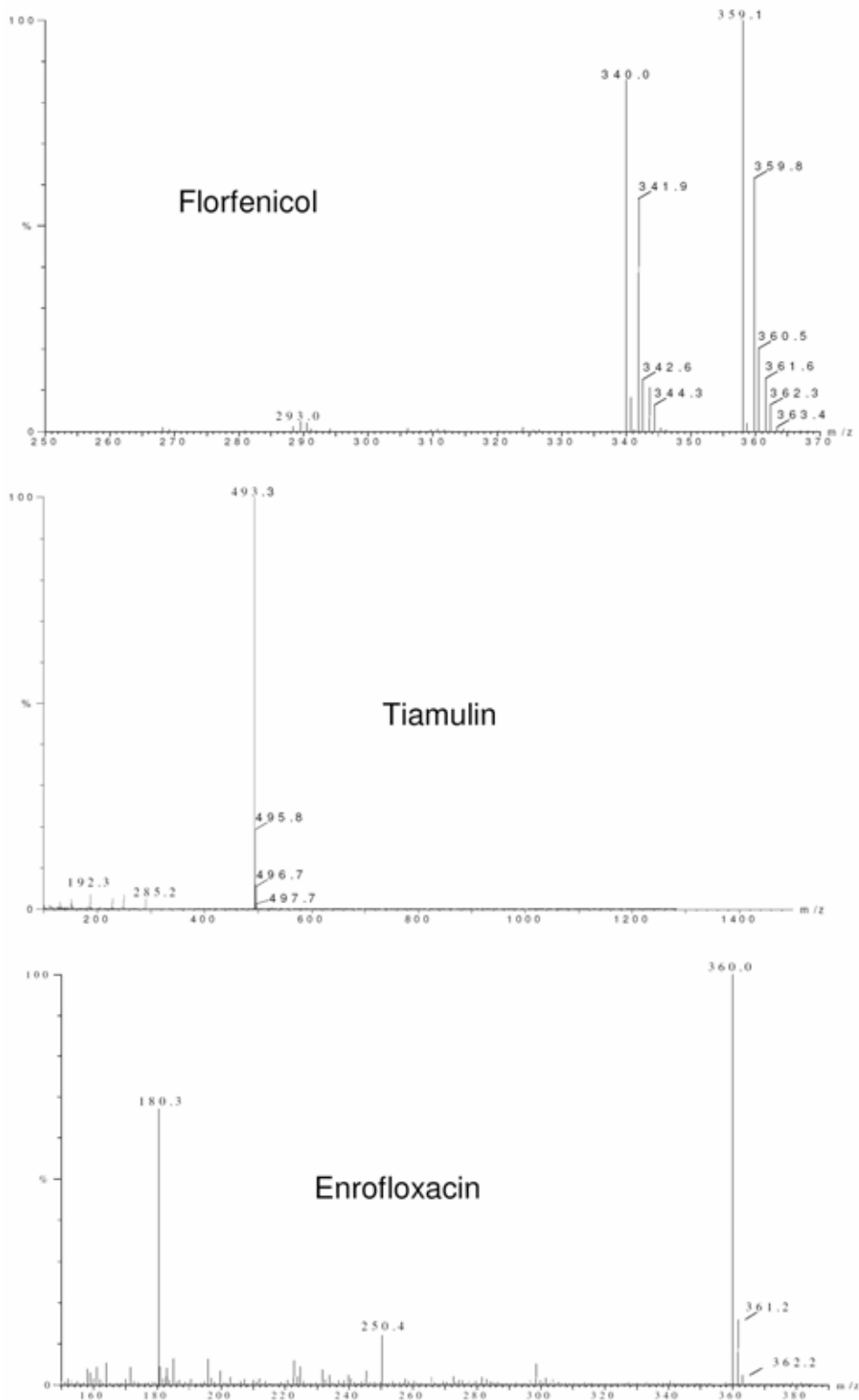


Abbildung 23: Massenspektren (ESP+) von Florfenicol, Tiamulin und Enrofloxacin (c= 10 µg/ml)

Abbildung 24 zeigt die dazu typischen Chromatogramme einer Standardlösung.

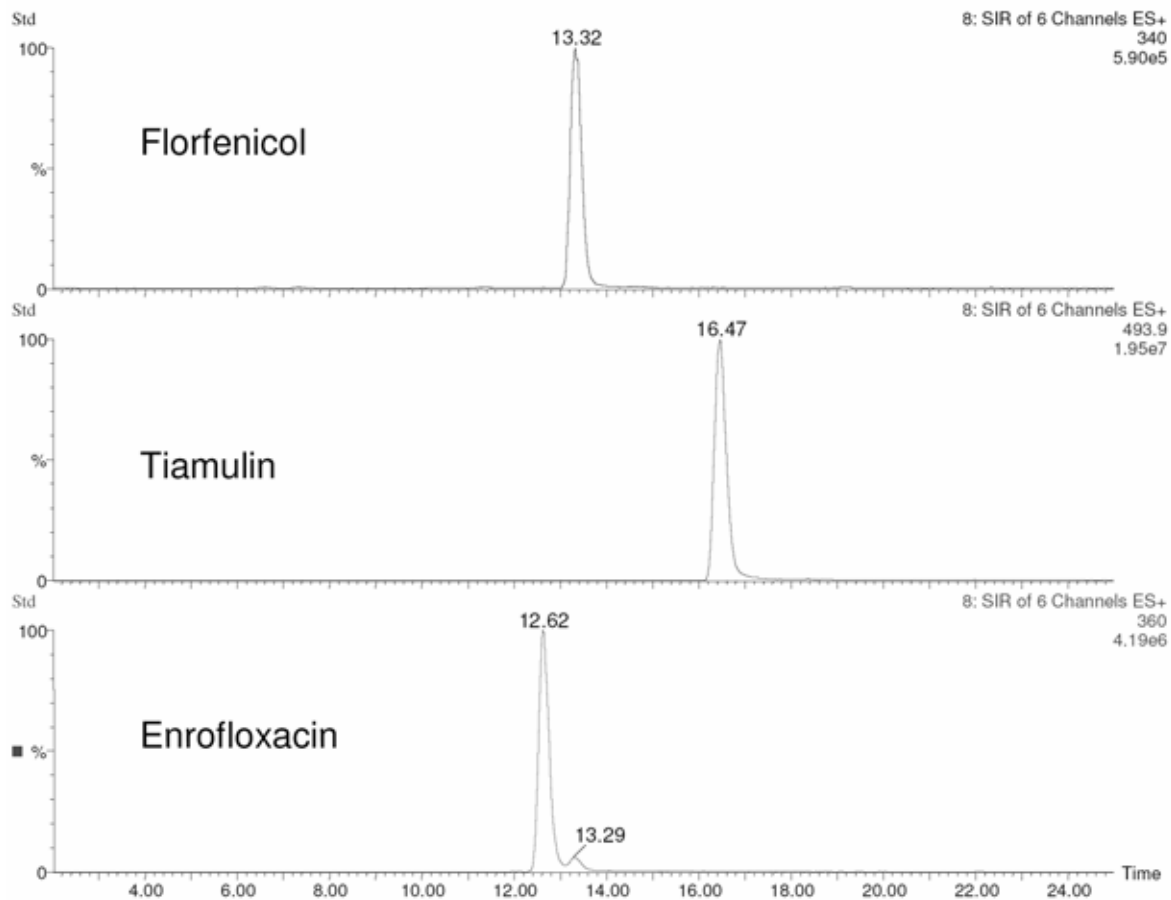


Abbildung 24: Chromatogramme eines Mischstandards mit Florfenicol, Tiamulin und Enrofloxacin ( $c = 100 \mu\text{g/ml}$ )

Aufgrund der gewonnenen Daten wurden zum Nachweis von Florfenicol, Enrofloxacin und Tiamulin die in Tabelle 21 aufgelisteten Ionen aufgezeichnet.

Tabelle 21: Aufgezeichnete Quasimolekular- und Ionenmassen (Atlantis  $C_{18}$ , Grad1, ESP+)

Substanz	[m/z]	Retentionszeit [min]
Florfenicol	<b>359</b> , 340,293	13,3
Enrofloxacin	<b>360</b> , 250,180	12,6
Tiamulin	<b>493</b> , 285,192	16,5



### 3 Methodenentwicklung

#### 3.1 Methodenfindung zum Nachweis von Tetrazyklinen

##### Probenvorbereitung

Bei der Vorbereitung der Proben zur Analyse von Tetrazyklinen erwies sich ein Citratpuffer mit pH 4,7 am günstigsten zur **pH Regulierung**. Bereits 1 ml dieses Puffers konnte Güllen (1g Einwaage) im pH Bereich zwischen 6 und 9 auf einen Bereich zwischen 5,0 und 5,8 einstellen.

Ein möglicher Einfluss des **Trockensubstanzgehaltes** auf Wiederfindungsraten oder Matrixeffekte wurde durch die Pufferzugabe (Verdünnungseffekt) minimiert. So konnten im Analyseverfahren keine Unterschiede zwischen Proben mit hohem TS (12%) und niedrigem TS (1%) beobachtet werden.

Eine Zentrifugation zur Grobreinigung vor der Extraktion war durch die Wahl einer Flüssig-Flüssigextraktion nicht nötig. Prinzipiell konnte eine Adsorption an die Feststoffpartikel der Gülle beobachtet werden. So minderte die Zentrifugation die Wiederfindungsrate bei Güllen mit hohem TS um 13,2% bis 20,3% ( $\bar{x}=15,8\%$ ) und wurde daher nicht durchgeführt. Der Effekt ließ sich jedoch durch Zugabe des Citratpuffers aufheben, da dadurch die Tetrazykline in Lösung gebracht wurden.

Auch eine Lyophilisierung der Gülle brachte keine Vorteile, da bei der anschließenden Extraktion mit Methanol bzw. Acetonitril keine ausreichenden Wiederfindungsraten erzielt werden konnten (Tabelle 22).

Einen entscheidenden Einfluss auf die Wiederfindungsrate hatte die Wahl der Reaktionsgefäße. Bei der Gruppe der Tetrazykline konnte festgestellt werden, dass die Wiederfindungsraten erheblich reduziert waren (um 23,5% bis 30,4%,  $\bar{x}=27,4\%$ ), wenn Glaswaren verwendet wurden. Eine Vorbehandlung der Reagenzröhrchen mit einer methanolischen EDTA-Lösung, wie bei SEZENSNY (2001) beschrieben, konnte diesen Effekt jedoch minimieren. Noch geeigneter erwiesen sich Polypropylen-Reagenzröhrchen, die daher beim Extraktionsverfahren verwendet wurden; die HPLC-Fläschchen, bei denen nicht auf Kunststoffmaterial ausgewichen werden konnte, wurden mit methanolischer EDTA-Lösung gespült.

##### Extraktion

Als Extraktionsmittel erwies sich Ethylacetat als am besten geeignet, da mit anderen Lösungsmitteln nur eine geringe Wiederfindungsrate erreicht werden konnte oder starke Interferenzen bei der Analyse auftraten (Tabelle 22). In Kombination mit einer zweimaligen Extraktion wurden so Wiederfindungsraten bis zu 79,6% erreicht. Weitere Wiederholungen der Extraktionsschritte brachten keine

Verbesserung, da sich hierbei auch der Anteil der die Analyse störenden Substanzen erhöhte.

Tabelle 22: Einfluss des Extraktionsmittels auf die Nachweisbarkeit von Chlor-tetrazyklin

Extraktionsmittel	Wiederfindungsrate* von CTC im Rohextrakt [%] ( $\pm$ SD) [%]	Besonderheiten
Ethylacetat	79,6 (15,4)	-
TBME	56,7 (18,9)	Interferenzen
MeOH	-	Starke Interferenzen
MeOH/Reinstwasser	-	Starke Interferenzen
ACN	-	Starke Interferenzen
ACN/Reinstwasser	-	Starke Interferenzen

\* Mittelwert aus 5 Wiederholungen

- keine Quantifizierung möglich

### Aufreinigung

Da der Rohextrakt noch zu viele Verunreinigungen enthielt, wurde im Anschluss an die Extraktion mit Ethylacetat eine Flüssig-Flüssigtrennung mit Hexan mit einer Festphasenextraktion (StrataX-Säulen, polymerbasiertes Material) kombiniert. Dadurch konnten die meisten Verunreinigungen abgetrennt und so störende Interferenzen reduziert werden.

### **3.2 Methodenfindung zum Nachweis von Sulfonamiden und weiteren Antibiotika**

Da die Methode zum Nachweis der Tetrazykline für die Sulfonamidanalyse auf Grund zu geringer Wiederfindungsraten nicht geeignet war, wurde sie im Hinblick auf die Wahl des Puffers modifiziert. Es zeigte sich, dass mit einem Sörensenpuffer mit dem pH-Wert 7,0 die besten Ergebnisse bei der anschließenden Extraktion mit Ethylacetat erzielt werden konnten. Allerdings war eine größere Puffermenge nötig, um den gewünschten pH-Bereich für die Extraktion der Gülle sicherzustellen. Die Extraktionsmittelmenge wurde entsprechend erhöht, um so die Wiederfindungsraten um bis zu 20% zu erhöhen. Durch die Vielzahl der Verbindungen im Bereich der Sulfonamide (15 Verbindungen) war hinsichtlich des eingestellten pH-Wertes ein Kompromiss einzugehen. Im neutralen pH-Bereich konnte für alle un-

tersuchten Sulfonamide zufrieden stellende Wiederfindungsraten von 56,8 bis zu 116,9% erzielt werden.

Eine Aufsatzung der Gülle vor der Extraktion mit Natriumchlorid, wie bei HALLER et al. (2002) beschrieben, brachte hier keine verbesserten Wiederfindungsraten.

Ansonsten zeigte sich in den Vorversuchen, dass die weiteren Aufreinigungsschritte von der Tetrazyklinanalyse übernommen werden konnten, bis auf den Unterschied, dass die HPLC-Fläschchen nicht mit methanolischer EDTA-Lösung gespült werden sollten, da sonst verminderte Wiederfindungsraten (um 12,3% bis 15,0%,  $\bar{x}$  =13,2%) zu beobachten waren.



Ein Vergleich dieser Peaks mit denen der Standardverbindungen zeigte, dass die beiden kleineren Peaks von 4-Epi-Chlortetrazyklin stammen. Zusätzlich fallen die Retentionszeiten des Iso-Chlortetrazyklins mit denen des 4-Epi-Chlortetrazyklin zusammen (Abbildung 21). Daher konnte auf Grund der fehlen Abtrennbarkeit und der Signalüberlagerung keine weitere Unterscheidung gemacht werden. Bei den Gehalten ist somit der Gesamt-Chlortetrazyklingehalt (CTC, Epi-CTC, Iso-CTC) angegeben. Semiquantitative Bestimmungen (artifiziiell kontaminierter Proben und Feldproben mit Konzentrationen über 1 mg/kg) zeigten, dass der Anteil an unverändertem Chlortetrazyklin bei durchschnittlich 40% lag.

In Tabelle 23 sind die mittleren Wiederfindungsraten der Tetrazykline in den verschiedenen Konzentrationsstufen dargestellt. Die Bestimmbarkeitsgrenze, definiert als die niedrigste mit bestimmter Präzision und Richtigkeit ermittelte Konzentration, lag bei 0,1 mg/kg.

Tabelle 23: Wiederfindungsraten für Tetrazykline in Gülle bei verschiedenen Konzentrationsstufen

Substanz	Mittlere Wiederfindung [%]	Wiederfindung* ( $\pm$ SD) [%]		
		5 mg/kg	0,5 mg/kg	0,1 mg/kg
Chlortetrazyklin**	75,3	75,8 (7,5)	79,6 (6,4)	70,7 (5,6)
Tetrazyklin	70,3	70,1 (8,6)	73,5 (4,7)	67,3 (8,7)
Oxytetrazyklin	67,0	68,5 (5,4)	69,0 (7,3)	63,4 (4,9)
Doxyzyklin	60,5	64,5 (3,5)	59,3 (8,9)	57,6 (9,3)

\* Mittelwert aus 5 Wiederholungen

\*\* Gesamt-Chlortetrazyklin

Durch die entwickelte Methode wurden mittlere Wiederfindungsraten von 60,5% bis 75,3% erreicht. Die Nachweisgrenze, die die kleinste noch detektierbare Konzentration darstellt, bis zu der Gehalte noch quantitativ erfassbar sind, lag für die Analyse von Chlortetrazyklin und Doxyzyklin bei 0,05 mg/kg, für Tetrazyklin bei 0,04 mg/kg und für Oxytetrazyklin bei 0,06 mg/kg.

## 4.2 Sulfonamide

In Abbildung 26 ist exemplarisch jeweils ein Chromatogramm einer Sulfadiazin- und Trimethoprim-haltigen Gülle aufgezeichnet.

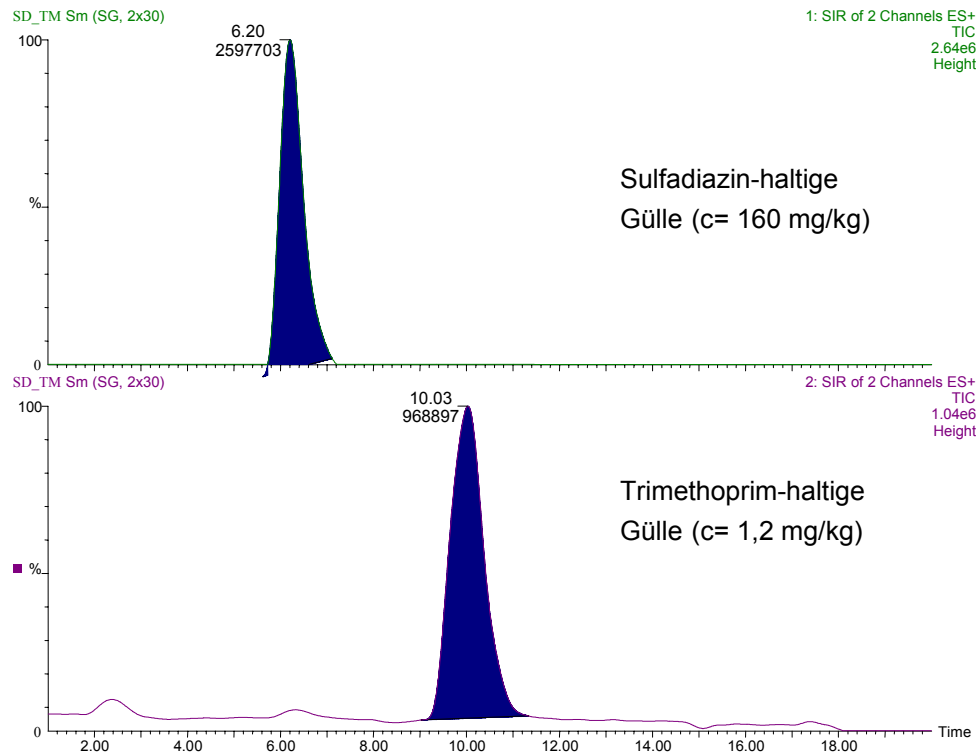


Abbildung 26: Chromatogramme einer Sulfadiazin/Trimethoprim-haltigen Gülle

Bei der Analyse der Sulfonamide wurden mittlere Wiederfindungsraten von 61,5% bis 105,4% ermittelt (Tabelle 24). Für Sulfamethazin, N4-Acetyl-Sulfamethazin, Sulfamerazin, Sulfamethoxazol und Sulfadimethoxin wurde eine Nachweisgrenze von 0,02 mg/kg erreicht. Bei den weiteren Sulfonamiden lag sie in Höhe der Bestimmbarkeitsgrenze (0,05 mg/kg).

Tabelle 24: Wiederfindungsraten für Sulfonamide und Trimethoprim in Gülle bei verschiedenen Konzentrationsstufen

Substanz	Mittlere Wiederfindung [%]	Wiederfindung* ( $\pm$ SD) [%]			
		5 mg/kg	0,5 mg/kg	0,1 mg/kg	0,05 mg/kg
Sulfadiazin	84,9	86,7 (9,4)	79,4 (7,4)	71,4 (13,3)	102,0 (6,0)
N4-Acetyl-Sulfamethazin	90,6	98,3 (3,2)	95,7 (8,6)	87,1 (9,4)	81,1 (6,5)
Sulfathiazol	87,2	72,9 (4,0)	96,0 (9,4)	95,1 (12,3)	84,8 (7,0)
Sulfamethoxazol	90,0	74,9 (7,2)	66,2 (6,9)	107,2 (10,5)	111,3 (10,2)
Sulfaguanidin	61,5	56,8 (10,5)	60,1 (5,4)	67,5 (5,3)	-
Sulfamerazin	88,3	84,1 (6,6)	85,7 (7,1)	98,2 (7,0)	85,0 (7,9)
Sulfamethazin	105,4	94,9 (6,3)	110,3 (5,9)	115,0 (7,5)	101,6 (1,8)
Sulfadimethoxin	86,5	70,7 (5,0)	60,8 (4,1)	100,3 (7,7)	115,2 (7,6)
Sulfochloro-pyridazin	94,0	81,5 (7,5)	89,1 (3,6)	92,5 (13,7)	113,2 (9,8)
Sulfamethoxy-pyrazin	87,5	71,8 (6,4)	69,6 (5,5)	114,2 (20,9)	94,5 (6,2)
Sulfameter	86,1	70,3 (6,2)	68,2 (3,1)	112,8 (15,4)	93,2 (1,9)
Sulfadoxin	95,9	85,6 (6,3)	82,7 (5,3)	98,3 (8,2)	116,9 (9,1)
Sulfaphenazol	97,7	98,1 (9,7)	101,7 (10,5)	99,1 (12,7)	84,1 (6,6)
Sulfisomedin	82,7	74,6 (10,9)	115,0 (7,9)	58,5 (7,8)	-
Sulfapyridin	93,0	92,7 (9,8)	79,8 (5,5)	104,8 (16,1)	94,7 (4,3)
Trimethoprim	91,0	98,2 (17,3)	98,2 (7,6)	83,3 (7,3)	84,4 (7,8)

\* Mittelwert aus 5 Wiederholungen

### 4.3 Weitere Antibiotika

Die mittleren Wiederfindungsraten für die weiteren untersuchten Antibiotika lagen zwischen 71,9% und 90,7% (Tabelle 25). Für Florfenicol und Tiamulin lag die Nachweisgrenze bei 0,02 mg/kg, für Enrofloxacin bei 0,1 mg/kg.

Tabelle 25: Wiederfindungsraten für Florfenicol, Enrofloxacin, Tiamulin in Gülle bei verschiedenen Konzentrationsstufen

Substanz	Mittlere Wiederfindung [%]	Wiederfindung* ( $\pm$ SD) [%]			
		5 mg/kg	0,5 mg/kg	0,1 mg/kg	0,05 mg/kg
Florfenicol	75,2	79,1 (5,3)	64,7 (10,9)	69,3 (2,6)	88,0 (3,8)
Enrofloxacin	71,9	55,9 (8,1)	97,0 (2,6)	62,8 (5,5)	-
Tiamulin	90,7	90,5 (8,3)	98,1 (12,3)	81,1 (8,5)	93,2 (5,1)

\* Mittelwert aus 5 Wiederholungen



## 5 Ergebnisse der Lagerungsversuche

### 5.1 Lagerverhalten von Chlortetrazyklin in Gülle

Die Lagerung chlortetrazyklin-haltiger Gülle unter Laborbedingungen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bzw.  $7^{\circ}\text{C}$  führte binnen 5 Monaten zu keinem Abbau.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde dotierte und „natürlich kontaminierte“ Chlortetrazyklin-haltige Gülle in zwei Konzentrationsstufen bei  $7^{\circ}\text{C}$  über einen Zeitraum von 32 Wochen gelagert. Auch hier konnte weder ein Abbau im beobachteten Zeitraum noch ein Unterschied zwischen „natürlich kontaminierter“ Gülle und den dotierten Proben festgestellt werden (Abbildung 27).

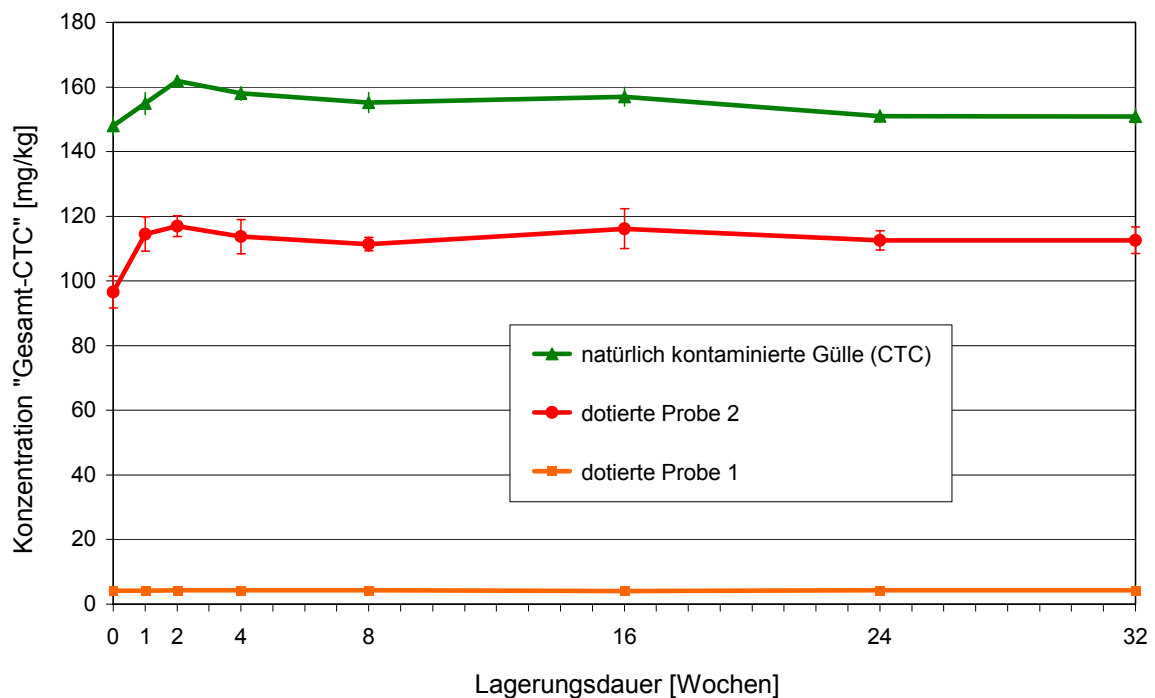


Abbildung 27: Einfluss der Lagerdauer auf den „Gesamt-CTC-Gehalt“ in Gülle (Lagertemperatur  $7^{\circ}\text{C}$ ,  $\pm$  SD,  $n=5$ )

## 5.2 Lagerverhalten von Sulfonamiden in Gülle

Das Lagerverhalten von Sulfadiazin und Trimethoprim wurde über einen Zeitraum von 32 Wochen bei einer Temperatur von 7°C überprüft. Zum einen wurde „natürlich produzierte“ Gülle verwendet, zum anderen dotierte Gülleproben in zwei Konzentrationsstufen.

Wie in Abbildung 28 ersichtlich, wurde die Konzentration von Sulfadiazin in der nativen Probe innerhalb von einer Woche um 37,5% reduziert. Ein vergleichbares Resultat wurde in der hoch dotierten Probe erzielt (Reduktion um 28,0%). In den folgenden Wochen der Lagerung nahm diese Konzentration nicht weiter ab. In der niedrig dotierten Probe war insgesamt kein Abbau festzustellen.

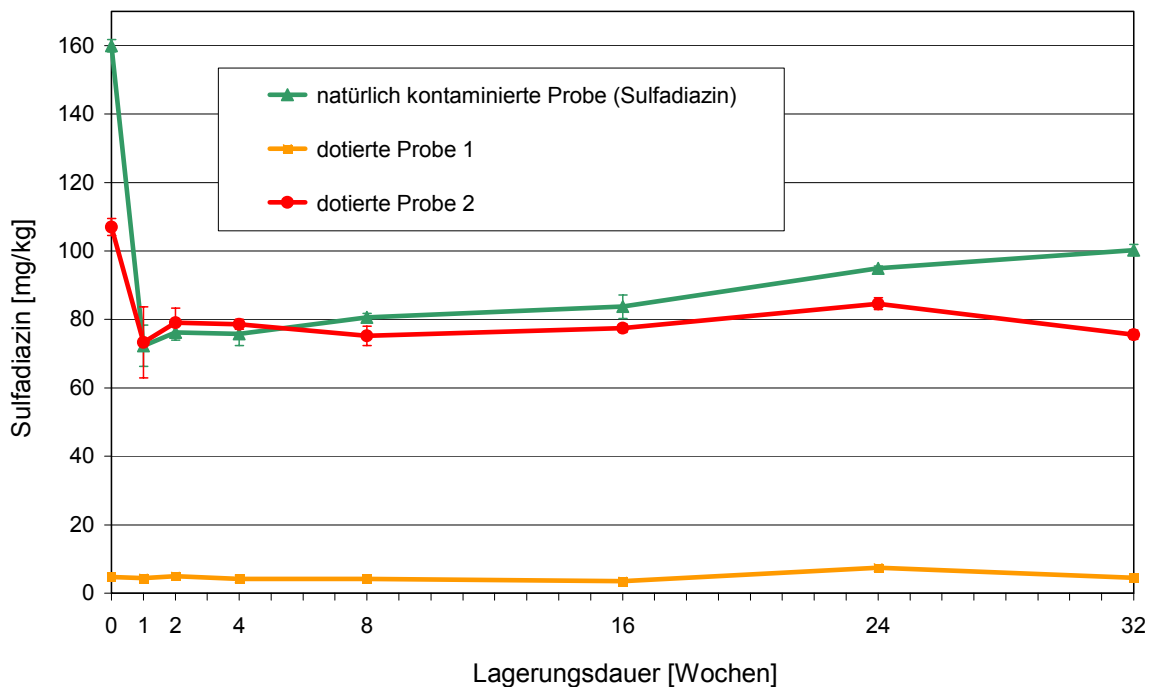


Abbildung 28: Einfluss der Lagerdauer auf den Gehalt an Sulfadiazin in Gülle (Lagertemperatur 7°C,  $\pm$  SD, n=5)

Eine Bildung des N4-Acetyl-Metaboliten des Sulfadiazin konnte lediglich in Gülle von mit Sulfadiazin behandelten Tieren nachgewiesen werden; hieraus kann geschlossen werden, dass der Metabolit im Tier gebildet wurde (Abbildung 29). Dotierte Gülleproben, zeigten dagegen bei Aufzeichnung der charakteristischen Ionenmassen zur entsprechenden Retentionszeit kein Signal.

Eine Quantifizierung war jedoch nicht möglich, da die Konzentration des aus Sulfadiazin synthetisierten Vergleichsstandards nicht bekannt war.

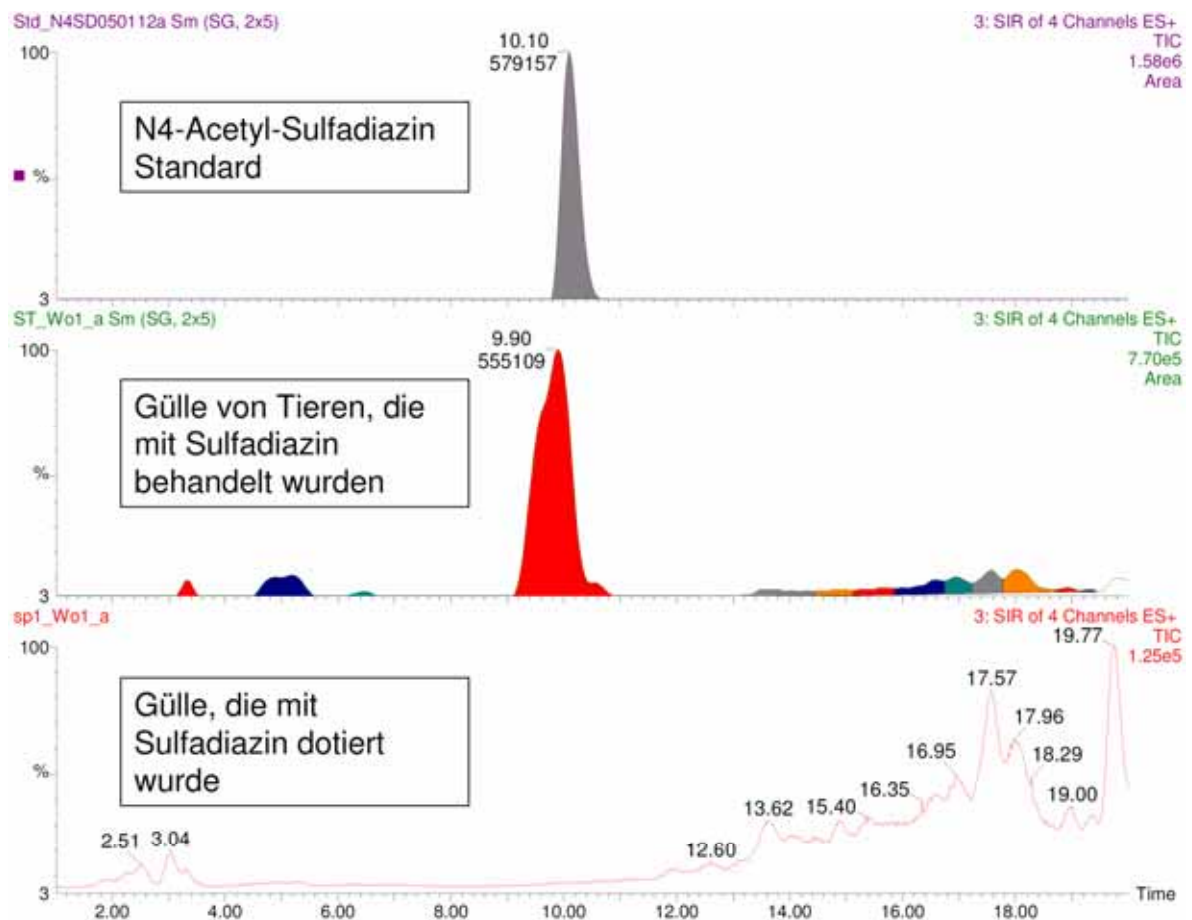


Abbildung 29: Chromatogramme eines N4-Acetyl-Sulfadiazin Standards und sulfadiazinhaltiger Gülle

Bei dem Wirkstoff Trimethoprim war ein starker Abbau innerhalb von vier Wochen zu beobachten. Spuren blieben jedoch auch noch nach 32 Wochen nachweisbar (Abbildung 30).

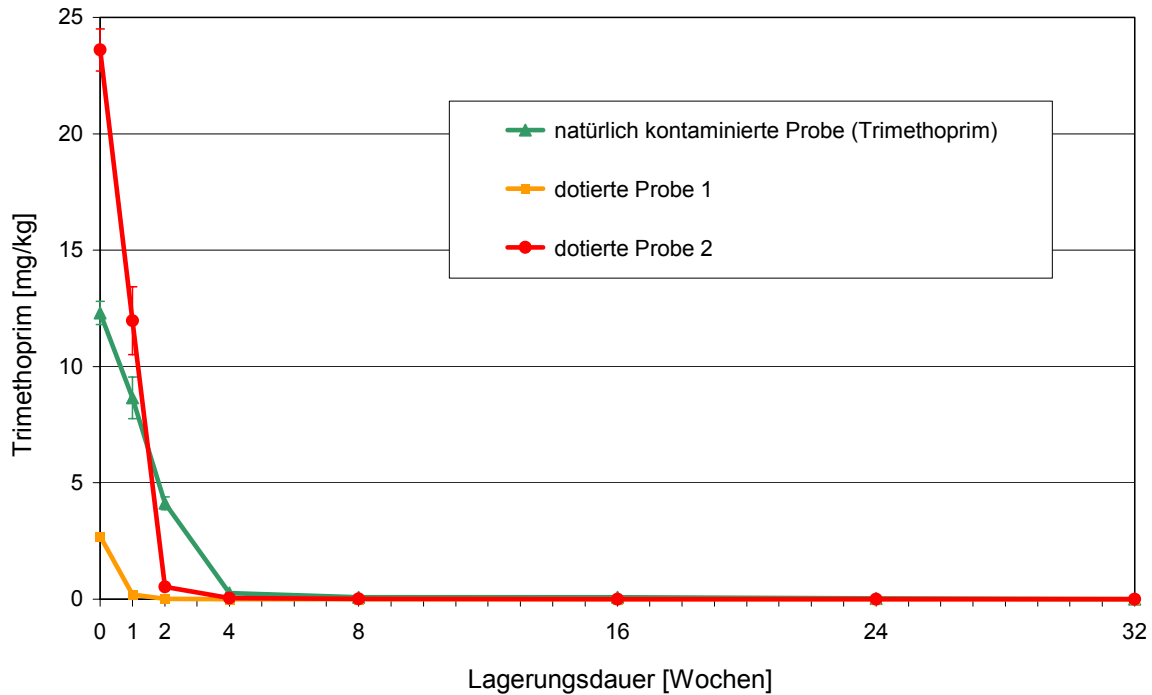


Abbildung 30: Einfluss der Lagerdauer auf den Gehalt an Trimethoprim in Gülle (Lagerungstemperatur 7°C,  $\pm$  SD, n=5)

In einem weiteren Lagerungsversuch im Labormaßstab wurde das Verhalten der Sulfonamide bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen (-20°C; 7°C, Raumtemperatur) über einen Zeitraum von 16 Wochen untersucht. Hierbei verhielten sich nicht alle Sulfonamide gleich (Tabelle 26). So konnte bei Sulfamethazin oder Sulfaguanidin bei keiner der überprüften Temperaturen eine Konzentrationsreduktion beobachtet werden. Andere Verbindungen wurden jedoch innerhalb von 16 Wochen zumindest teilweise reduziert. Dies geschah bei Raumtemperatur meist schneller als bei niedrigeren Lagerungstemperaturen (7°C). Im gefrorenen Zustand (-20°C) fand kein Abbau statt.

Tabelle 26: Abbaurrate [%] von verschiedenen Sulfonamiden und weiterer Antibiotika in Gülle innerhalb von 16 Wochen bei unterschiedlichen Temperaturen

Substanz	Mittlerer Abbau (n=5) [%] bei		
	-20°C	7°C	Raumtemperatur (ca. 20-22°C)
Sulfadiazin	0	0	0
Sulfadimethoxin	0	20	30
Sulfachloropyridazin	5	10	10
Sulfaguanidin	0	0	0
Sulfisomedin	0	0	0
Sulfamerazin	0	0	0
Sulfamethazin	0	0	0
N4-Acetyl-Sulfamethazin	0	60	65
Sulfamethoxazol	0	80	80
Sulfamethoxypyrazin	0	0	0
Sulfaphenazol	0	25	30
Sulfapyridin	0	0	0
Sulfathiazol	0	15	30
Enrofloxacin	20	80	80
Florfenicol	0	75	80
Tiamulin	0	10	25
Trimethoprim	0	70	70

Für Sulfamerazin konnte, wie auch für Sulfamethoxypyrazin, Sulfaguanidin, Sulfapyridin, Sulfisomedin und Sulfadiazin, über diesen Zeitraum temperaturunabhängig kein Abbau nachgewiesen werden (Abbildung 31).

Im Gegensatz dazu wurde bei z.B. Sulfamethoxazol sowohl bei 7°C als auch bei Raumtemperatur eine Konzentrationsabnahme beobachtet werden. Bei Raumtemperatur erfolgte diese schneller. Bei der gefrorenen Probe blieb die Konzentration konstant (Abbildung 32).

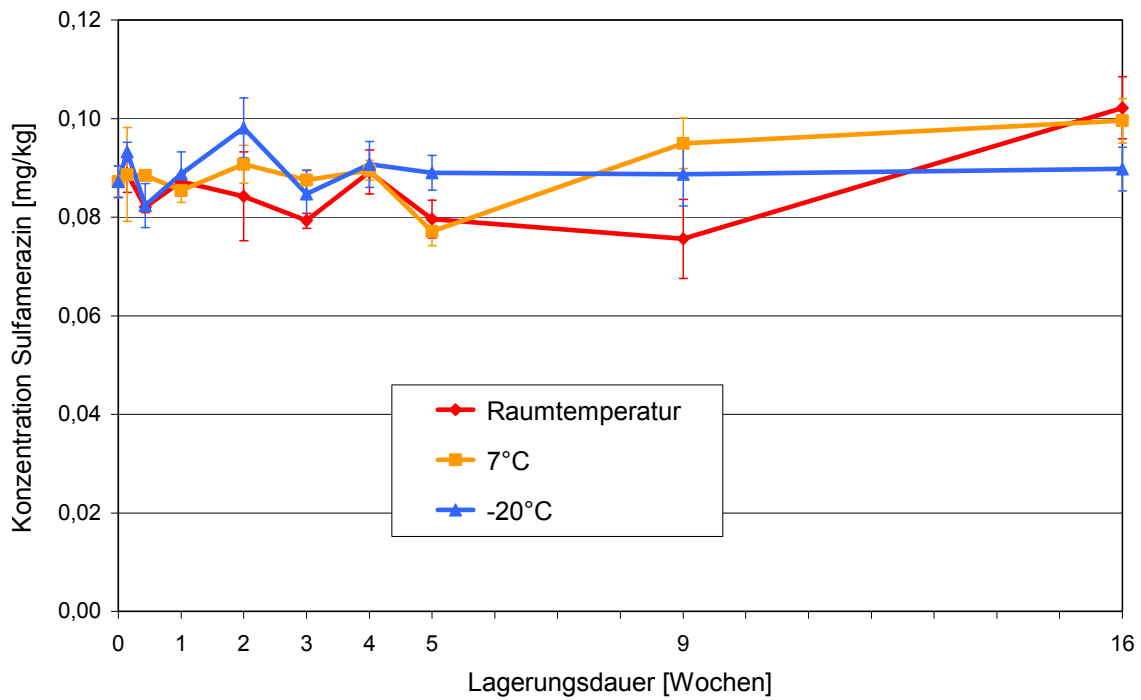


Abbildung 31: Lagerverhalten von Sulfamerazin in Gülle bei unterschiedlichen Temperaturen ( $\pm$  SD, n=5)

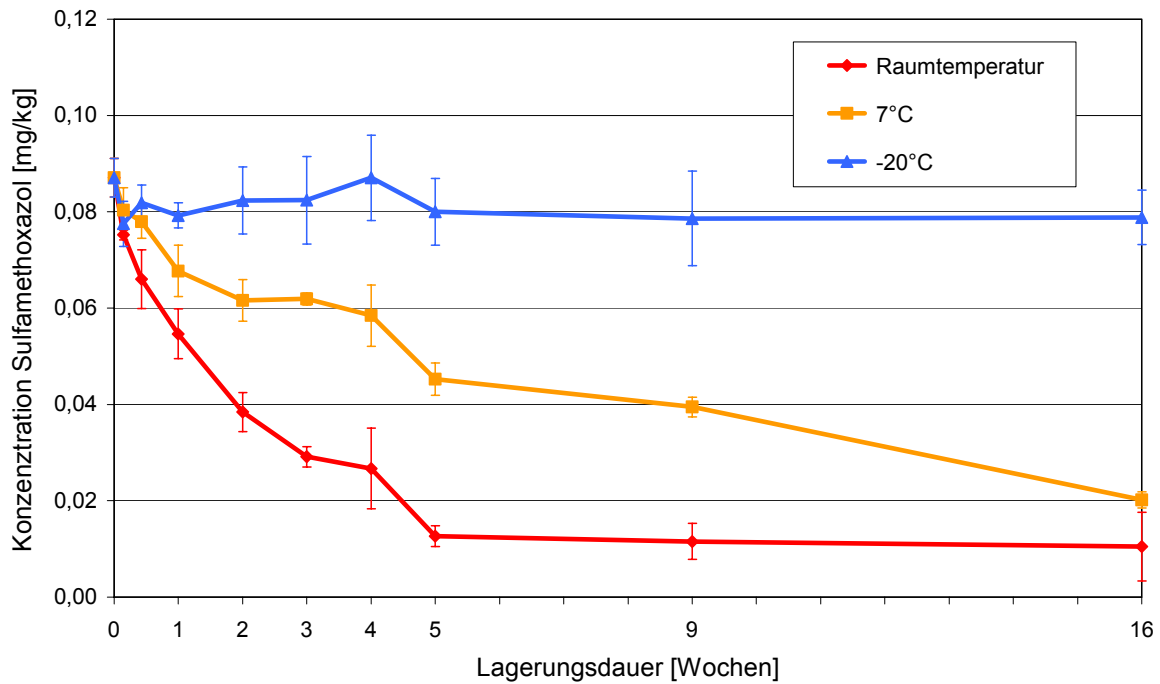


Abbildung 32: Lagerverhalten von Sulfamethoxazol in Gülle bei unterschiedlichen Temperaturen ( $\pm$  SD, n=5)

## 6 Antibiotikagehalte in Schweinegülle

### 6.1 Antibiotikagehalte der Standardgülle

Die bei der metaphylaktischen Behandlung („CTC 100“, belapharm, Vechta) entstandene Chlortetrazyklin-haltige Gülle wies eine Konzentration von 120 mg Gesamt-CTC/kg auf.

Die Gülle der Tiere, die mit dem Präparat Antastmon medikamentiert wurden, enthielt 160 mg Sulfadiazin/kg und 1,2 mg Trimethoprim/kg.

### 6.2 Antibiotikagehalte der Gülle des Rückstandsmonitorings

#### 6.2.1 Vorkommen von Tetrazyklinen

In 140 Proben (37%) konnte bei einer Bestimmbarkeitsgrenze von 0,1 mg/kg Chlortetrazyklin nachgewiesen werden. Tetrazyklin konnte in 111 Proben (29%) nachgewiesen werden. In 16 Proben (4%) konnte Oxytetrazyklin mit Gehalten zwischen 0,1 bis 0,9 mg/kg (Median 0,14 mg/kg) detektiert werden. Doxyzyklin fand sich in 5 Proben (1%) in Konzentrationsbereichen zwischen 0,1 und 0,7 mg/kg (Tabelle 27). Die Werte wurden nicht um die Wiederfindungsrate korrigiert.

Tabelle 27: Vorkommen von Tetrazyklinen in Schweinegülle (N=380)

Substanz	Positive Befunde <sup>1</sup>		Konzentrationen [mg/kg]	
	[n]	[%]	Median*	Streuung (min-max)
Chlortetrazyklin	140	37	0,34	0,1 - 50,8
Tetrazyklin	111	29	0,68	0,1 - 46,0
Oxytetrazyklin	16	4	0,14	0,1 - 0,9
Doxyzyklin	5	1	0,38	0,1 - 0,7

<sup>1</sup> (> 0,1 mg/kg)

\* positive Befunde

Der kumulativen Häufigkeitsverteilung der jeweiligen Konzentrationen oberhalb der Bestimmbarkeitsgrenze (Abbildung 33) kann entnommen werden, dass ca. 11% der Befunde über 1 mg/kg Chlortetrazyklin enthielten, 8% der Proben lagen im Konzentrationsbereich über 2 mg/kg. Bei der Tetrazyklinanalyse lagen ca. 13% der Proben im Konzentrationsbereich über 1 mg/kg.

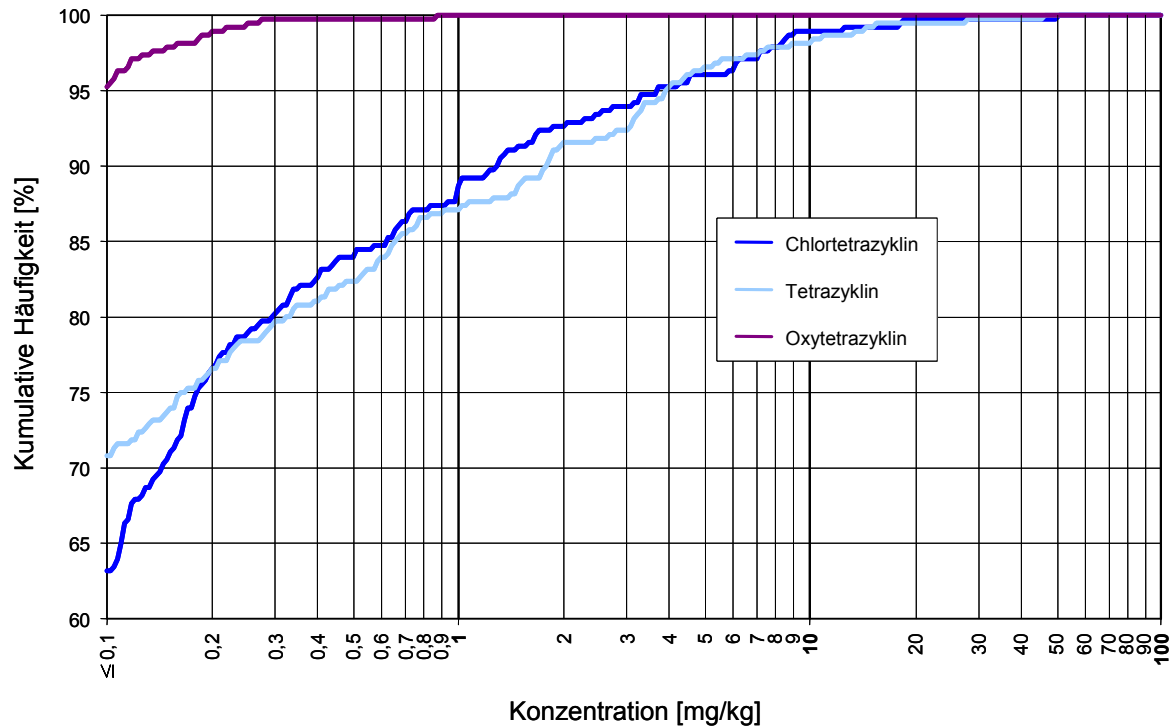


Abbildung 33: Kumulative Häufigkeitsverteilung der Tetrazyklingehalte in Schweinegülle (N=380)

Eine Betrachtung der Konzentration bezogen auf die Betriebstypen und -größen ist in Abbildung 34 dargestellt. Der Median der positiven Befunde aller Proben lag bei 0,3 mg/kg.

Bei den großen Betriebsgrößen lag der Median der Chlortetracyklingehalte höher als bei kleineren Betriebsformen. Zwischen den Betriebsformen Mast und Zucht ließen sich keine deutlichen Unterschiede in den Medianwerten feststellen.

Bei der Analyse auf Tetrazyklin zeigte sich zwar ein ähnliches Bild (Abbildung 35), tendenziell wiesen die Medianwerte zwischen den beiden Betriebsgrößen eines Betriebstyps aber keine so großen Unterschiede auf wie bei Chlortetracyklin.



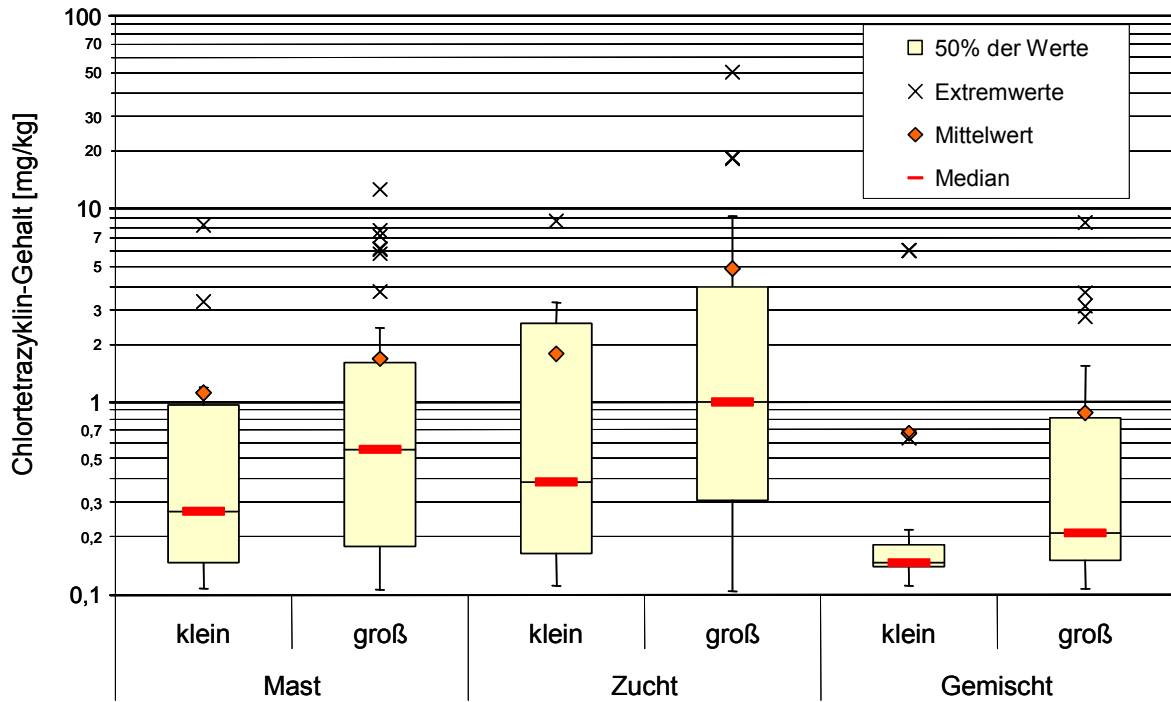


Abbildung 34: Verteilung der positiven Chlortetracyklinbefunde in Gülle in Abhängigkeit von Betriebstyp und -größe (Boxplot)

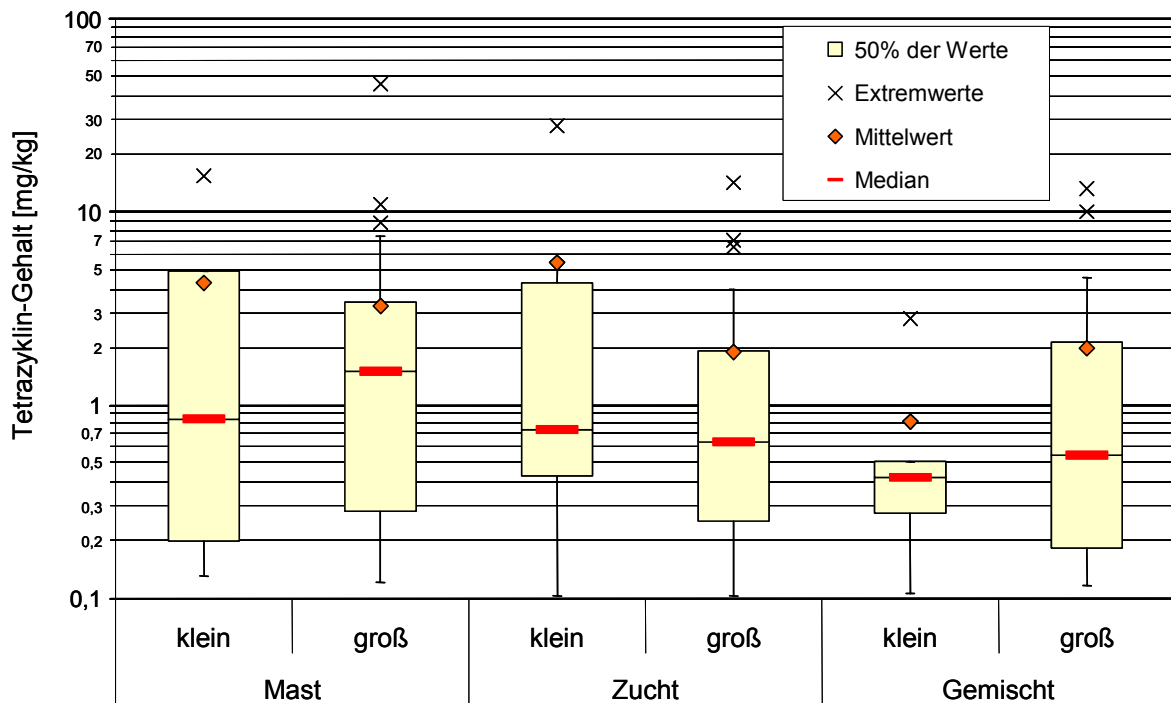


Abbildung 35: Verteilung der positiven Tetracyklinbefunde in Gülle in Abhängigkeit von Betriebstyp und -größe (Boxplot)

Die Einteilung der Tetrazyklingehalte wurde in Anlehnung an die Empfindlichkeitsprädi­katklassen der MHK-Werte für Tetrazykline (DIN 58940-4-Beiblatt 1:2004-02) vorgenommen (<0,1 mg/kg; [0,1 mg/kg bis 0,5 mg/g; 0,5 bis 1 mg/kg]; 1 mg/kg bis 4 mg/kg; ≥ 4 mg/kg). Auch hier war ersichtlich, dass sich der größte prozentuale Anteil der Proben im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 mg/kg und 0,5 mg/kg Frischmasse befand (Abbildung 36). In 4,7% der Proben konnte Chlortetrazyklin in Konzentrationen über 4 mg/kg detektiert werden.

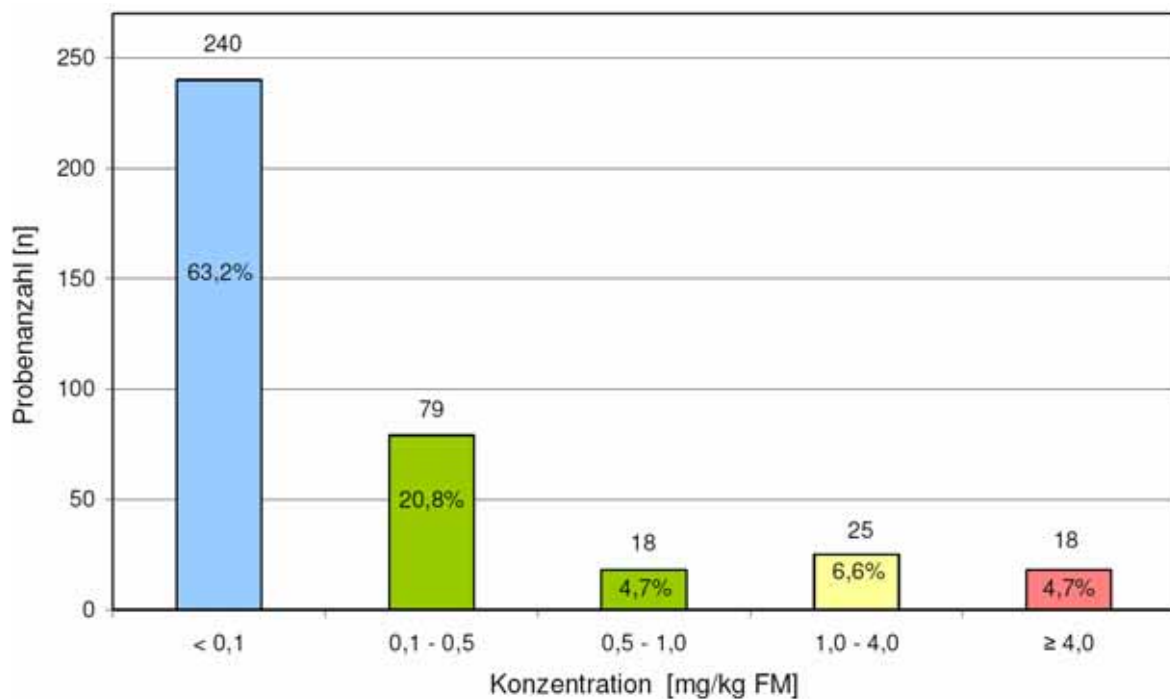


Abbildung 36: Verteilung der Befunde an Chlortetrazyklin („Gesamt-CTC“) auf ausgewählte Konzentrationsbereiche

Bei differenzierter Betrachtung der Betriebsgrößen zeigte sich, dass bei Mast- oder Zuchtbetrieben ein gleich hoher Prozentsatz der großen Betriebe (6,7%) in die höchste Konzentrationsklasse (über 4 mg/kg) fiel. Bei den kleinen Betrieben lag dieser Anteil bei unter 3%. Auch im Anteil der negativen Befunde war über alle Betriebstypen ein Unterschied zwischen den großen und kleinen Betrieben zu erkennen. Dieser Unterschied war bei den Mast- und Gemischtbetrieben auf dem Signifikanzniveau 0,1% signifikant (Abbildung 37).

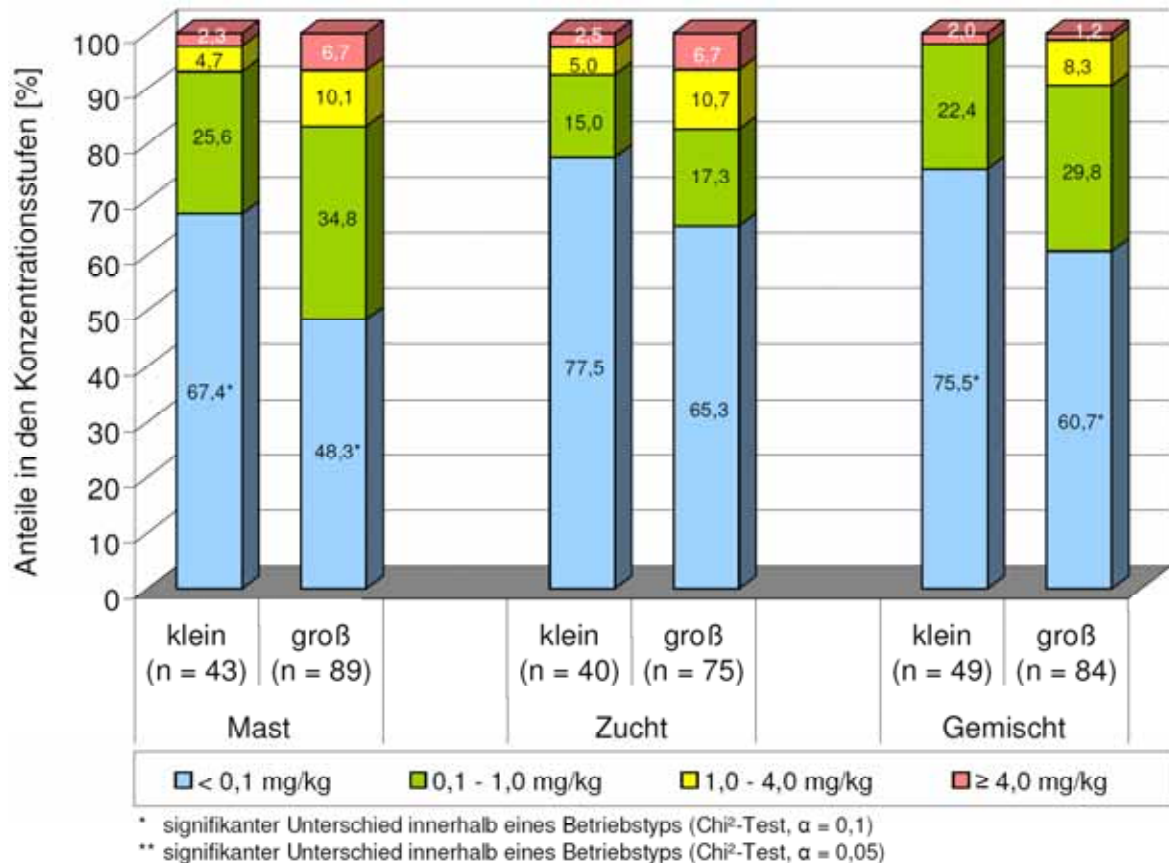


Abbildung 37: Prozentuale Verteilung CTC-positiver Befunde auf ausgewählte Konzentrationsbereiche

Für Tetrazyklin spiegelt sich ein sehr ähnliches Bild wider (Abbildung 38). Bei den kleineren Betrieben war der Anteil der negativen Befunde unterhalb der Bestimmbarkeitsgrenze (0,1 mg/kg) signifikant höher (Signifikanzniveau 0,05%) als bei den großen Betrieben. Im Konzentrationsbereich über 4 mg/kg unterschieden sich die Betriebsgrößen der Mastbetrieben, nicht jedoch die der Zuchtbetrieben, signifikant.

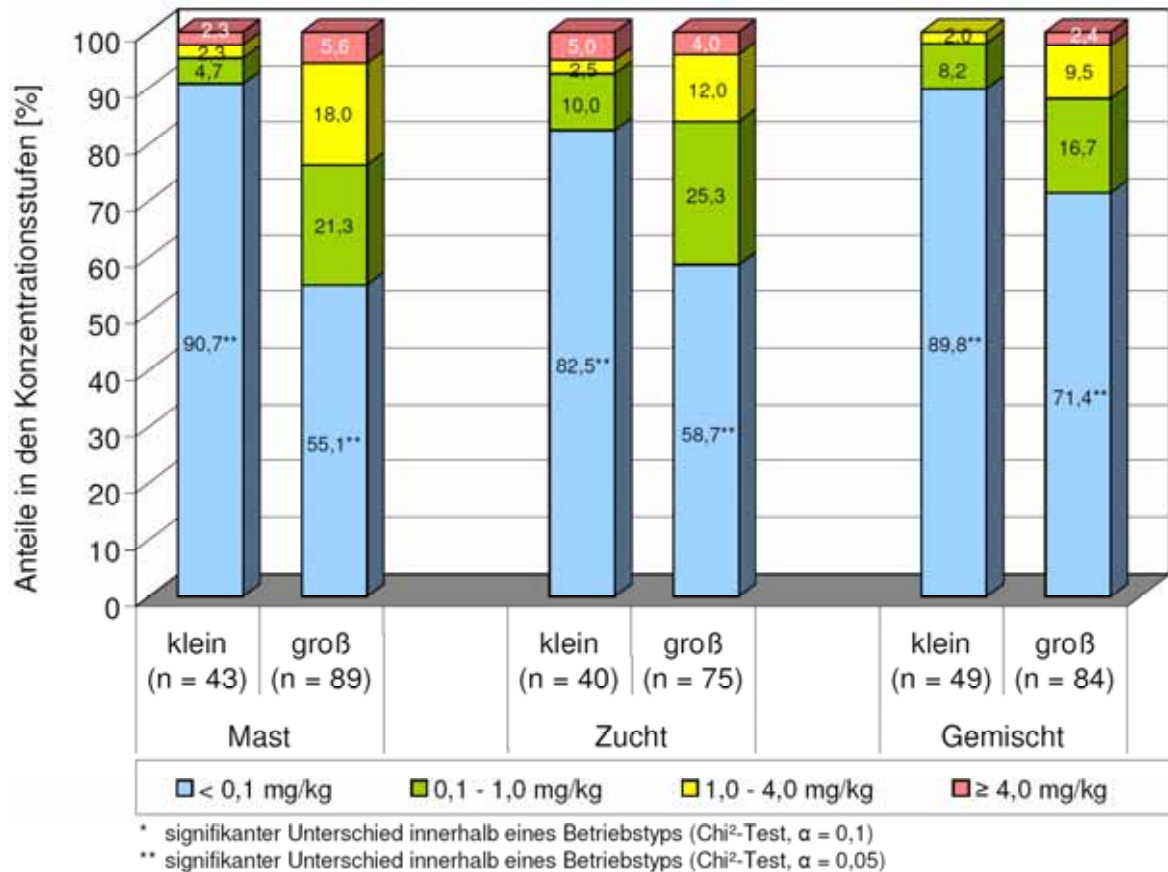


Abbildung 38: Prozentuale Verteilung TC-positiver Befunde auf ausgewählte Konzentrationsbereiche

### 6.2.2 Vorkommen von Sulfonamiden

In den Proben des Güllemonitorings konnten Sulfamethazin (+ N4-Acetyl-Sulfamethazin), Sulfadiazin (+ N4-Acetyl-Sulfadiazin), Sulfamerazin (+ N4-Acetyl-Sulfamerazin), Sulfathiazol, Sulfamethoxazol und Sulfadimethoxin nachgewiesen werden. Die prozentualen Anteile der positiven Befunde und Angaben zu den gemessenen Konzentrationsbereichen sind in Tabelle 28 dargestellt.

In 181 Proben (48%) konnte Sulfamethazin, in 117 Proben (31%) der N4-Acetyl-Metabolit bestimmt werden (> 0,05 mg/kg). Sulfadiazin konnte in 19 Proben nachgewiesen werden. Für die weiteren Sulfonamide (Sulfaguanidin, -pyridazin, -dixin, -isomedin, -pyridin, und Sulfameter) und Trimethoprim konnte mit den gewählten Methoden (Bestimmbarkeitsgrenzen siehe Tabelle 24) kein positiver Nachweis erbracht werden.

Tabelle 28: Vorkommen von Sulfonamiden in Schweinegülle (N=380)

Substanz	Positive Befunde		Konzentration [mg/kg]	
	[n]	[%]	Median*	Streuung (min-max)
Sulfamethazin	181	48	0,12	0,05 - 38
N4-Acetylsulfamethazin	117	31	0,01	0,05 - 27
Sulfadiazin	19	5	0,78	0,1 - 5
N4-Acetylsulfadiazin	19	5	-**	-
Sulfamerazin	7	2	0,15	0,7 - 0,9
N4-Acetylsulfamerazin	5	1	-**	-
Sulfamethoxazol	3	1	0,05	0,05 - 0,05
Sulfathiazol	5	1	0,07	0,05 - 0,1
Sulfadimethoxin	5	1	0,19	0,05 - 0,6

<sup>1</sup> (< 0,05 mg/kg)

\* positive Befunde

\*\* Gehaltsbestimmung nicht möglich, da kein quantitativer Standard erhältlich

Aus der kumulativen Häufigkeitsverteilung der Sulfonamidanalyse (Abbildung 39) wird der geringe Anteil hochbelasteter Proben ersichtlich. Während bei der Untersuchung der Gülle auf Tetrazykline ca. 92% der Proben Werte unter 2 mg/kg aufwiesen waren dies bei den Sulfonamiden 97 bis 99%.

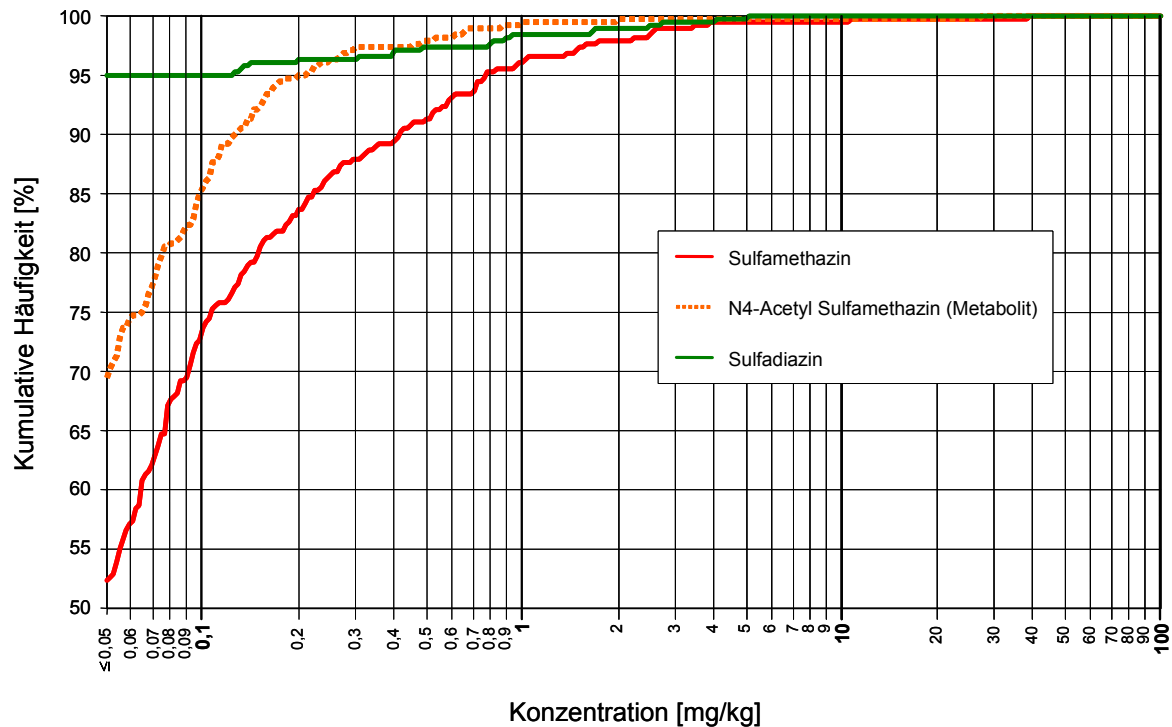


Abbildung 39: Kumulative Häufigkeitsverteilung der Sulfonamidgehalte in Schweinegülle (N=380)

Die Verteilung der positiven Befunde von Sulfamethazin und dessen N4-Acetyl-Metaboliten auf die einzelnen Betriebsformen ist in Abbildung 40 abgebildet. Die Mediane der kleinen und großen Mastbetriebe lagen hier sehr nahe zusammen (ca. 0,1 mg/kg). Im Gegensatz dazu lag der Median der großen Zuchtbetriebe deutlich höher. Bei den Gemischtbetrieben war diese Tendenz ebenfalls zu beobachten, jedoch in geringerem Ausmaß.

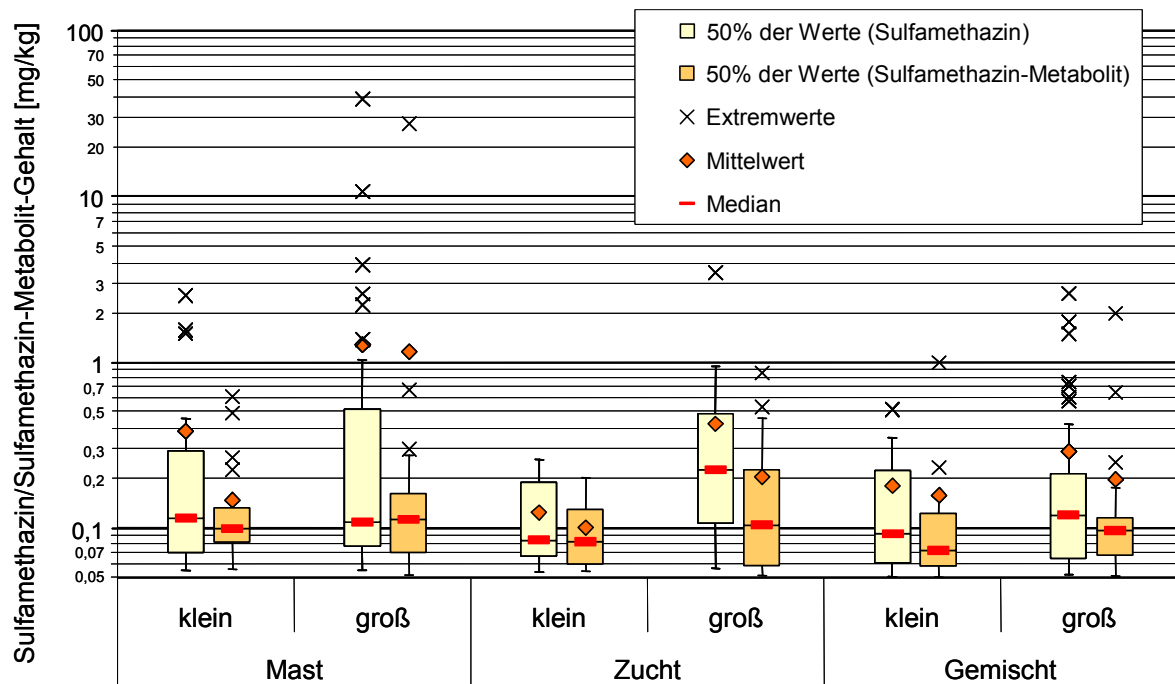


Abbildung 40: Verteilung der positiven Sulfamethazin/N4-Acetyl-Sulfamethazin (Metabolit)-Gehalte in Abhängigkeit von Betriebstyp und -größe (Boxplot)

Generell lagen die detektierten Sulfonamidgehalte der unter denen der Tetrazyklinbestimmung. So konnten lediglich in 2,2% der großen Mastbetriebe Konzentrationen über 4 mg/kg (Sulfamethazin) nachgewiesen werden. Bei den übrigen Betriebstypen wurde diese Konzentrationsstufe nie erreicht. Ein signifikanter Unterschied der negativen Befunde zwischen den Betriebsgrößen war lediglich bei den Gemischtbetrieben zu verzeichnen (Signifikanzniveau 0,05%) (Abbildung 41).

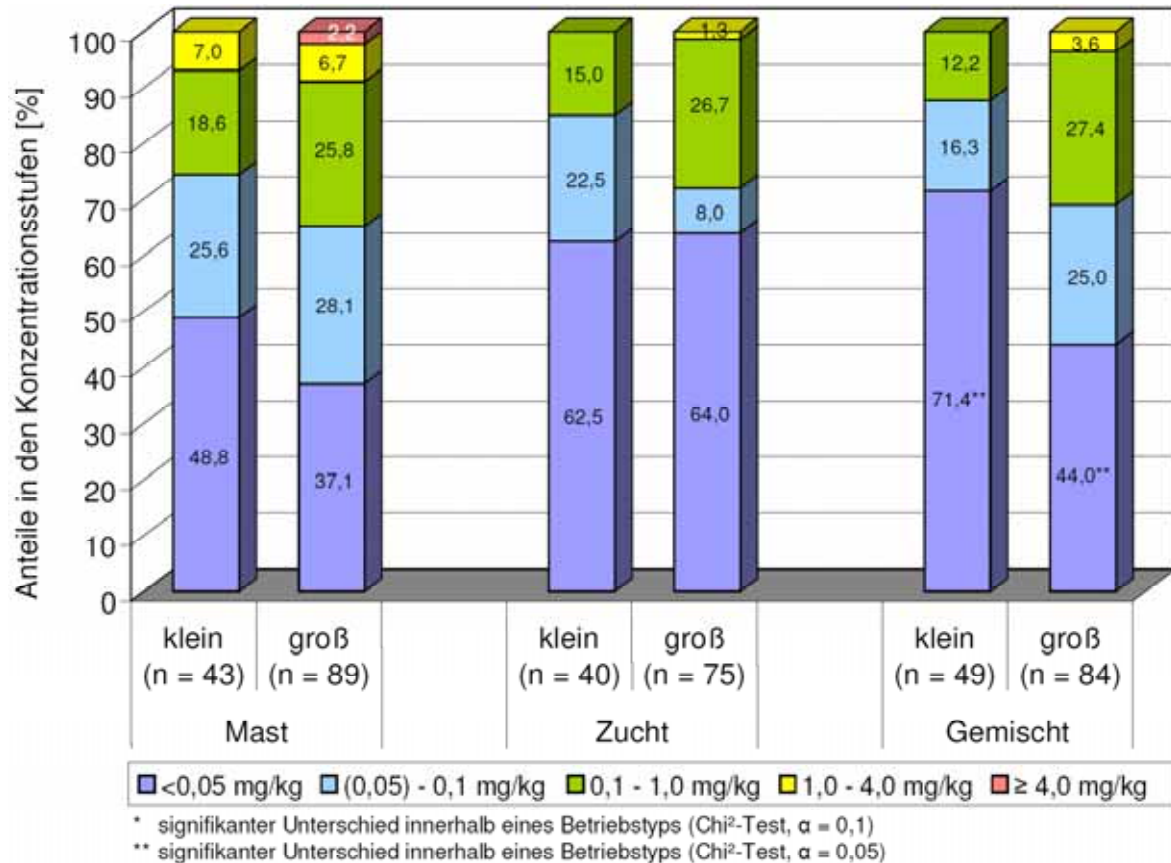


Abbildung 41: Prozentuale Verteilung Sulfamethazin-positiver Befunde auf ausgewählte Konzentrationsbereiche

In 29 Proben konnte mehr als ein Sulfonamid nachgewiesen werden. Neun Proben enthielten Sulfamethazin (+ N4-Metabolit) und Sulfadiazin. In 3 Proben konnten sowohl Sulfamethazin (+ N4-Metabolit), Sulfadiazin als auch Sulfamerazin detektiert werden.

### 6.2.3 Gehalte an weiteren Antibiotika

Die Analyse der Proben auf die weiteren Antibiotika Enrofloxacin und Florfenicol ergab bei einer Bestimmbarkeitsgrenze von 0,1 mg/kg keine positiven Befunde. Tiamulin konnte in einer Probe mit einer Konzentration von 0,5 mg/kg nachgewiesen werden.



## 6.2.4 Betrachtung aller untersuchten Antibiotika

### Probenahmezeitpunkt

Die Beprobung wurde auf Grund der schwierigen Witterungsverhältnisse im Herbst 2002 im Frühjahr 2003 fortgesetzt. Ein möglicher Einfluss des Probenahmezeitpunktes ist in Abbildung 42 dargestellt. Hier wird deutlich, dass im Frühjahr ein höherer Anteil der Proben bei Chlortetrazyklin und Tetrazyklin im Konzentrationsbereich über 4 mg/kg lag. Bei Sulfamethazin war dies ebenfalls bei Gehalten über 0,5 mg/kg zu beobachten. Der Unterschied im Anteil der negativen Befunde war bei Chlortetrazyklin und Tetrazyklin jeweils im Herbst signifikant (Signifikanzniveau 0,05%). Bei mit Einbeziehung der kleinen Konzentrationsgruppen bei Sulfamethazin war auch hier ein deutlicher Unterschied sichtbar.

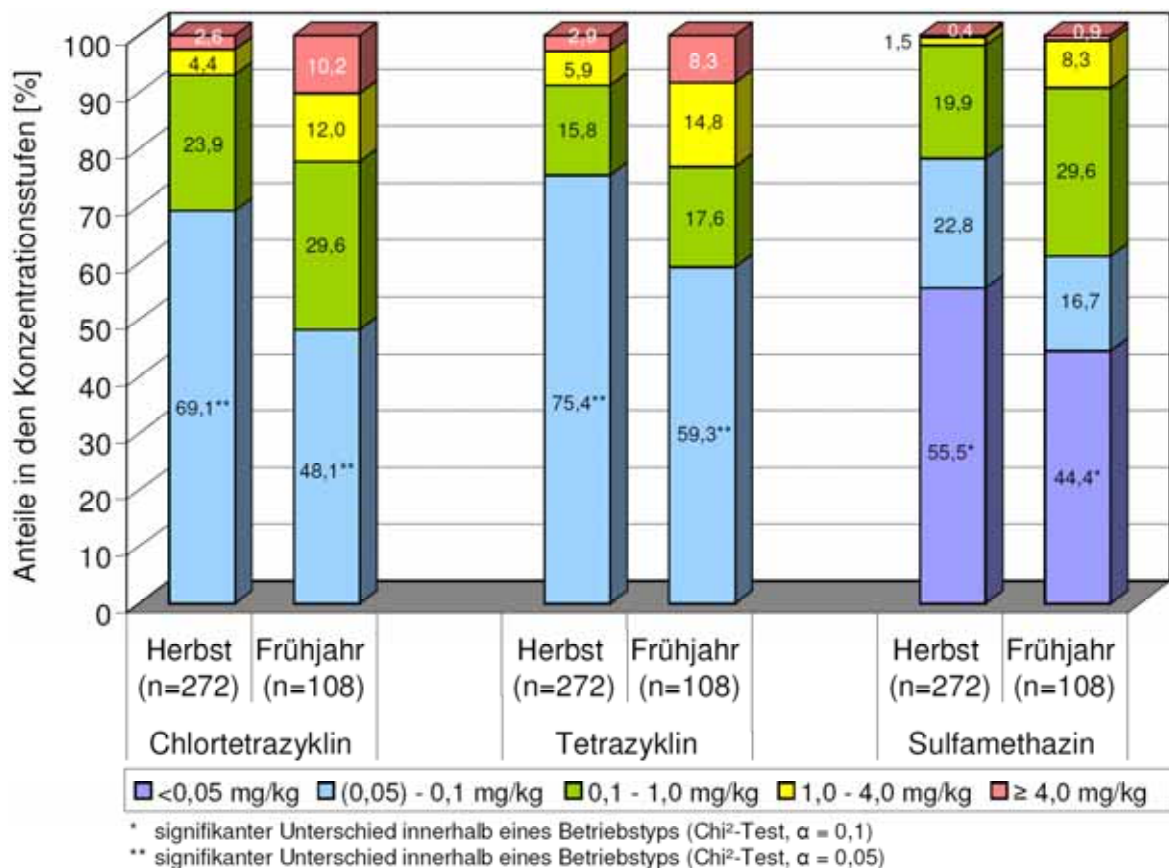


Abbildung 42: Prozentuale Verteilung CTC, TC und SMT-positiver Befunde auf ausgewählte Konzentrationsbereiche in Abhängigkeit vom jahreszeitlichen Beprobungszeitraum

### Mehrfachbefunde

In Tabelle 29 sind die Mehrfachbefunde der Tetrazyklin- und Sulfonamidanalyse dargestellt. 112 Proben (29,5%) enthielten bei gegebener Bestimmbarkeitsgrenze keine der untersuchten Substanzen. 135 Proben (35,5%) wiesen einen, 76 (20,0%) zwei Wirkstoffe auf. In 46 Proben (12,1%) konnten drei, in 9 Proben (2,4%) vier der untersuchten Antibiotika detektiert werden. Zwei Proben (0,5%) enthielten fünf Wirkstoffe.

Wurde nur ein Sulfonamid gefunden, so war dies in nahezu allen Fällen SMT, lediglich in vier Fällen wurde ein anderes Sulfonamid detektiert.

Tabelle 29: Mehrfachbefunde Tetrazykline und Sulfonamide  
(alle Betriebstypen und Betriebsgrößen)

		Tetrazykline			Summe	
		negative Befunde <sup>1</sup> [n]	positive Befunde [n]			
			CTC	TC	CTC + TC	
<b>Sulfonamide</b>	negative Befunde <sup>2</sup> [n]	112	36	33	14	<b>195</b>
	positive Befunde [n]					
	1 Sulfonamid	66	42	13	33	<b>154</b>
	2 Sulfonamide	7	5	7	8	<b>27</b>
	3 Sulfonamide	1	0	1	2	<b>4</b>
<b>Summe</b>		<b>186</b>	<b>83</b>	<b>54</b>	<b>57</b>	<b>380</b>

(<sup>1</sup> > 0,1 mg/kg) (<sup>2</sup> > 0,05 mg/kg)

In den folgenden Tabellen (Tabelle 30, Tabelle 31, Tabelle 32) sind diese Befunde für die einzelnen Betriebsformen und -größen dargestellt. Auffällig ist hierbei, dass die beiden Betriebe mit zwei Tetrazyklinen und drei Sulfonamiden große Mastbetriebe sind. Auch die 8 Proben mit positiven Vierfachbefunden (zwei Tetrazyklinen und zwei Sulfonamide) fallen mit einer Ausnahme in diese Klassifizierung.

Die Unterschiede zwischen den Betriebsgrößen sind bei den Mast- und den Gemischtbetrieben signifikant (Signifikanzniveau 0,05%). Bei den Zuchtbetrieben ist dieser lediglich auf dem Signifikanzniveau von 0,1% absicherbar.

Tabelle 30: Mehrfachbefunde Tetrazykline und Sulfonamide (Mastbetriebe)

Betriebstyp: <b>Mast</b> Betriebsgröße: <b>alle</b>		Tetrazykline				Summe
		negative Befunde <sup>1</sup> [n]	positive Befunde [n]			
			CTC	TC	CTC + TC	
<b>Sulfonamide</b>	negative Befunde <sup>2</sup> [n]	30	8	9	6	<b>53</b>
	positive Befunde [n]					
	1 Sulfonamid	23	22 (1)	4	14	<b>63 (1)</b>
	2 Sulfonamide	3	1	2	7	<b>13</b>
	3 Sulfonamide	1	0	0	2	<b>3</b>
<b>Summe</b>		<b>57</b>	<b>31</b>	<b>15</b>	<b>29</b>	<b>132</b>

Betriebstyp: <b>Mast</b> Betriebsgröße: <b>groß</b>		Tetrazykline				Summe
		negative Befunde <sup>1</sup> [n]	positive Befunde [n]			
			CTC	TC	CTC + TC	
<b>Sulfonamide</b>	negative Befunde <sup>2</sup> [n]	15	4	9	4	<b>32</b>
	positive Befunde [n]					
	1 Sulfonamid	11	16 (1)	4	12	<b>43 (1)</b>
	2 Sulfonamide	2	1	2	7	<b>12</b>
	3 Sulfonamide	0	0	0	2	<b>2</b>
<b>Summe</b>		<b>28</b>	<b>21</b>	<b>15</b>	<b>25</b>	<b>89</b>

Betriebstyp: <b>Mast</b> Betriebsgröße: <b>klein</b>		Tetrazykline				Summe
		negative Befunde <sup>1</sup> [n]	positive Befunde [n]			
			CTC	TC	CTC + TC	
<b>Sulfonamide</b>	negative Befunde <sup>2</sup> [n]	15	4	0	2	<b>21</b>
	positive Befunde [n]					
	1 Sulfonamid	12	6	0	2	<b>20</b>
	2 Sulfonamide	1	0	0	0	<b>1</b>
	3 Sulfonamide	1	0	0	0	<b>1</b>
<b>Summe</b>		<b>29</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>43</b>

Werte in Klammern: Positive Befunde ungleich SMT  
<sup>1</sup> (> 0,1 mg/kg) <sup>2</sup> (> 0,05 mg/kg)

Tabelle 31: Mehrfachbefunde Tetrazykline und Sulfonamide (Zuchtbetriebe)

Betriebstyp: <b>Zucht</b> Betriebsgröße: <b>alle</b>		Tetrazykline				Summe
		negative Befunde <sup>1</sup> [n]	positive Befunde [n]			
			CTC	TC	CTC + TC	
<b>Sulfonamide</b>	negative Befunde <sup>2</sup> [n]	36	14	16	4	<b>70</b>
	1 Sulfonamid	20 (2)	5 (1)	4	10	<b>39 (3)</b>
	2 Sulfonamide	1	1	3	1	<b>6</b>
	3 Sulfonamide	0	0	0	0	<b>0</b>
	<b>Summe</b>	<b>57</b>	<b>20</b>	<b>23</b>	<b>15</b>	<b>115</b>

Betriebstyp: <b>Zucht</b> Betriebsgröße: <b>groß</b>		Tetrazykline				Summe
		negative Befunde <sup>1</sup> [n]	positive Befunde [n]			
			CTC	TC	CTC + TC	
<b>Sulfonamide</b>	negative Befunde <sup>2</sup> [n]	19	9	14	4	<b>46</b>
	1 Sulfonamid	10 (1)	4 (1)	2	7	<b>23 (2)</b>
	2 Sulfonamide	1	1	3	1	<b>6</b>
	3 Sulfonamide	0	0	0	0	<b>0</b>
	<b>Summe</b>	<b>30</b>	<b>14</b>	<b>19</b>	<b>12</b>	<b>75</b>

Betriebstyp: <b>Zucht</b> Betriebsgröße: <b>klein</b>		Tetrazykline				Summe
		negative Befunde <sup>1</sup> [n]	positive Befunde [n]			
			CTC	TC	CTC + TC	
<b>Sulfonamide</b>	negative Befunde <sup>2</sup> [n]	17	5	2	0	<b>24</b>
	1 Sulfonamid	10 (1)	1	2	3	<b>16 (1)</b>
	2 Sulfonamide	0	0	0	0	<b>0</b>
	3 Sulfonamide	0	0	0	0	<b>0</b>
	<b>Summe</b>	<b>27</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>40</b>

Werte in Klammern: Positive Befunde ungleich SMT  
<sup>1</sup> (> 0,1 mg/kg) <sup>2</sup> (> 0,05 mg/kg)

Tabelle 32: Mehrfachbefunde Tetrazykline und Sulfonamide (Gemischte Betriebe)

Betriebstyp: <b>Gemischt</b> Betriebsgröße: <b>alle</b>		Tetrazykline				Summe
		negative Befunde <sup>1</sup> [n]	positive Befunde [n]			
			CTC	TC	CTC + TC	
<b>Sulfonamide</b>	negative Befunde <sup>2</sup> [n]	46	14	8	4	<b>72</b>
	1 Sulfonamid	23	15	5	9	<b>52</b>
	2 Sulfonamide	3	3	2	0	<b>8</b>
	3 Sulfonamide	0	0	1	0	<b>1</b>
	<b>Summe</b>	<b>72</b>	<b>32</b>	<b>16</b>	<b>13</b>	<b>133</b>

Betriebstyp: <b>Gemischt</b> Betriebsgröße: <b>groß</b>		Tetrazykline				Summe
		negative Befunde <sup>1</sup> [n]	positive Befunde [n]			
			CTC	TC	CTC + TC	
<b>Sulfonamide</b>	negative Befunde <sup>2</sup> [n]	22	7	5	3	<b>37</b>
	1 Sulfonamid	15	13	5	8	<b>41</b>
	2 Sulfonamide	1	2	2	0	<b>5</b>
	3 Sulfonamide	0	0	1	0	<b>1</b>
	<b>Summe</b>	<b>38</b>	<b>22</b>	<b>13</b>	<b>11</b>	<b>84</b>

Betriebstyp: <b>Gemischt</b> Betriebsgröße: <b>klein</b>		Tetrazykline				Summe
		negative Befunde <sup>1</sup> [n]	positive Befunde [n]			
			CTC	TC	CTC + TC	
<b>Sulfonamide</b>	negative Befunde <sup>2</sup> [n]	24	7	3	1	<b>35</b>
	1 Sulfonamid	8	2	0	1	<b>11</b>
	2 Sulfonamide	2	1	0	0	<b>3</b>
	3 Sulfonamide	0	0	0	0	<b>0</b>
	<b>Summe</b>	<b>34</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>49</b>

Werte in Klammern: Positive Befunde ungleich SMT  
<sup>1</sup> (> 0,1 mg/kg) <sup>2</sup> (> 0,05 mg/kg)

In Tabelle 33 sind die Mehrfachbefunde in den gewählten Konzentrationsbereichen (Summe der gemessenen Gehalte) dargestellt.

Näher zu betrachten sind die grau hinterlegten Zahlen. In fünf Betrieben konnten sowohl Tetrazyklin- als auch Sulfonamidgehalte über 4 mg/kg gemessen werden. Hierbei handelte es sich um vier große Mastbetriebe (mehr als 221 Masttiere) und einen großen Gemischtbetrieb (mehr als 31 Zuchtsauen). In 21 Proben konnte bei beiden untersuchten Antibiotikagruppen Gehalte zwischen 0,5 und 4 mg/kg detektiert werden. Hierbei handelte es sich um 12 Mast- (11 große, ein kleiner Betrieb), fünf Zucht- (große Betriebe mit mehr als 46 Zuchtsauen) und vier Gemischtbetriebe (drei große, ein kleiner Betrieb).

Tabelle 33: Anzahl der Befunde in ausgewählten Konzentrationsbereichen

		Sulfonamidkonzentration [mg/kg] (Summe aus SMT, ST, SM, SMX, SD, SDM)				
		< 0,05	0,05 – 0,1	0,1 – 0,5	0,5 – 4,0	über 4,0
Tetrazyklinkonzentration [mg/kg] (Summe aus CTC, TC)	< 0,1	112	42	22	10	0
	0,1 – 0,5	39	15	19	5	1
	0,5 – 4,0	28	13	16	21	0
	über 4,0	16	4	6	6	5

## E Diskussion

Mit den beiden entwickelten Multiresidue-**Methoden** war es möglich mehrere Antibiotika (4 Tetracycline bzw. 15 Sulfonamide und deren N4-Acetylmethylmetaboliten, Trimethoprim, Enrofloxacin, Tiamulin, Florfenicol) ab einer Bestimmbarkeitsgrenze von 0,1 mg/kg bzw. 0,05 mg/kg mit Wiederfindungsraten von 60 - 110% ( $\pm$  SD 2,6 - 10,9%) in Gülle zu detektieren. Thematisch vergleichbare Arbeiten von GRAFE (2000) und ENGELS (2004) erzielten Bestimmbarkeitsgrenzen von 0,5 mg/kg bzw. 0,8 mg/kg. HALLER et al. (2002) erreichten bei der Analyse von Sulfonamiden und Trimethoprim in Gülle eine Bestimmbarkeitsgrenze von 0,1 mg/kg.

Durch den Einsatz von Puffern und einer Flüssig-Flüssigextraktion in Kombination mit einer Festphasenaufreinigung konnten robuste Prozeduren entwickelt werden, die der Variabilität der Gülle z.B. hinsichtlich des Trockensubstanzgehaltes und des pH-Wertes Rechnung tragen. Es konnte daher auf aufwendige pH-Einstellung oder Aufsalzungen, wie in der Literatur bei HALLER et al. (2002) beschrieben, verzichtet werden. Entscheidend bei der Tetracyclinanalyse erwies sich zudem die Verwendung von Kunststoff-Reaktionsgefäßen bzw. von Glaswaren, die mit einer methanolischen EDTA-Lösung gespült wurden, um eine Komplexbildung zu vermeiden. Bei der Analyse der Sulfonamide und der weiteren Antibiotika wurde die EDTA-Spülung auf Grund reduzierter Wiederfindungsraten unterlassen.

Bei der Analyse von Chlortetracyclin konnte die epimere Verbindung 6-Iso-Chlortetracyclin chromatographisch nicht von 4-Epi-Chlortetracyclin und der Muttersubstanz abgetrennt werden. Da dies sowohl bei Chromatogrammen artifiziell kontaminierter als auch „natürlich hergestellter“ Chlortetracyclin-haltiger Gülle zu beobachten war, handelt es sich vermutlich um Präparationsartefakte; sie können jedoch auch schon im Tier bzw. während der Güllelagerung in Abhängigkeit vom pH-Wert entstehen (GROTE et al., 2004). Bei der Quantifizierung wurde der „Gesamt-CTC-Gehalt“ Chlortetracyclin, 4-Epi-Chlortetracyclin und 6-Iso-Chlortetracyclin angegeben. Die semiquantitative Auswertung relevanter Chromatogramme zeigte, dass der Anteil an unverändertem Chlortetracyclin bei ca. 40% lag.

In **Lagerungsversuchen mit Chlortetracyclin** bei Temperaturen von 7°C bzw. -20°C konnte eine Persistenz über einen Zeitraum von sechs Monaten beobachtet werden. Letzteres ist insofern von Bedeutung, als dass Verluste durch Abbaureaktionen bei der Probenaufbewahrung bei -20°C weitestgehend ausgeschlossen werden können. Die bei 7°C ebenfalls beobachtete hohe Stabilität von Chlortetracyclin bestätigt einerseits die Ergebnisse von GRAFE (2000), regt andererseits

jedoch an, über Technologien zur Minderung von Chlortetrazyklin-Gehalten in Gülle nachzudenken. Bereits LANGHAMMER (1989) ging auf mögliche Lösungen ein, um den Abbau von relativ stabilen Antibiotikarückständen zu verbessern. Als Beispiele wurden die Nutzung des mikrobiellen Potenzials durch Belüftung (Rühren) oder Frischgüllezufuhr und höhere Lagertemperatur genannt. Ergebnisse von KÜHNE et al. (2000) zeigen den Einfluss der Temperatur in Kombination mit einer Belüftung. Bei Raumtemperatur wurden so Halbwertszeiten von 9 Tagen in unbelüfteter bzw. 4,5 Tage in belüfteter Schweinegülle erreicht. Hier sind weitere Untersuchungen von großem Interesse, um Verfahren zur Reduktion der Rückstände, wie zum Beispiel durch die Nutzung von Biogasanlagen, zu entwickeln.

Bei einem **Lagerungsversuch** mit „natürlich produzierter“ **Sulfadiazin- und Trimethoprim-haltiger Gülle** wurde bei 7°C innerhalb des Zeitraumes von 32 Wochen eine Konzentrationsreduktion beobachtet. Bei Trimethoprim wurde eine nahezu vollständige Reduktion innerhalb von 3 - 4 Wochen beobachtet. Diese geringe Stabilität bestätigt Untersuchungen von PFEIFER et al. (2002) und SCHLÜSENER et al. (2003).

Bei Sulfadiazin war ein starker Abbau von bis zu 50% innerhalb der ersten Woche zu beobachten. In den darauf folgenden Wochen änderte sich der Gehalt allerdings nicht mehr. Bei der natürlich produzierten Gülle stieg im Gegensatz zur dotierten Gülle die Konzentration binnen 16 Wochen leicht an. Dies dürfte auf einer Rückaktivierung von N4-Acetyl-Sulfadiazin beruhen, eine Reaktion die von LANGHAMMER (1989) beschrieben worden ist. Da kein quantitativer Standard zur Verfügung stand, konnte die Kinetik dieser Rücktransformation nicht quantitativ erfasst werden. Darüber hinaus könnte der Anstieg durch eine Spaltung möglicher Sulfadiazin-Glucuronide begründet sein. Allerdings wird Sulfadiazin kaum glucuronidiert (Hauptmetabolit ist N4-Acetyl-Derivat) (VREE et al.; 1991), andererseits werden mit dem Harn ausgeschiedene Glucuronide durch mikrobielle  $\beta$ -Glucuronidasen in Gülle sehr rasch gespalten. Aus diesen Gründen wurden sie in der vorliegenden Arbeit nicht näher in Untersuchungen einbezogen.

Unter Laborbedingungen wurde das **Abbauverhalten** von 13 **Sulfonamiden** bei verschiedenen Temperaturen über einen Zeitraum von 16 Wochen geprüft. Hierbei wurden substanzspezifische Unterschiede festgestellt. Während sich Sulfamerazin, Sulfamethoxy-pyrazin, Sulfaguanidin und Sulfisomedin sowohl bei 7°C als auch bei Raumtemperatur (20 - 22°C) in Gülle als stabil erwiesen, wurde Sulfamethoxazol unter diesen Bedingungen um bis zu 80% reduziert. Dabei verlief der Abbau bei höheren Temperaturen schneller als bei niedrigen. Bei -20°C war lediglich bei Sulfachloropyridazin eine geringfügige Konzentrationsminderung um 5%



zu beobachten. Alle anderen geprüften Sulfonamide waren stabil, was für die Lagerung des Probenmaterials des Monitorings von Bedeutung ist.

Bei weiteren Versuchen zum **Abbauverhalten** unter Laborbedingungen zeigten **Enrofloxacin** und **Florfenicol** ab einer Lagertemperatur von 7°C eine starke Konzentrationsminderung von bis zu 80% innerhalb von 16 Wochen. **Tiamulin** wies hingegen eine höhere Persistenz auf und wurde im Versuchszeitraum bei 7°C nur um 10% reduziert.

In einem **bayernweiten Güllemonitoring** wurden 380 Güllen von schweinehaltenden Betrieben mit den entwickelten Methoden analysiert. In 29,5% der Proben konnte keine der untersuchten Verbindungen nachgewiesen werden; in 70,5% wurde mindestens ein Antibiotikum detektiert. Dies weist einerseits auf den weit verbreiteten Einsatz dieser Verbindungen in der Schweinehaltung hin, andererseits ist es auch Ausdruck der relativ hohen Umweltstabilität.

In 37% (140 Proben) der untersuchten Proben des Monitorings konnte **Chlortetrazyklin**, in 29% (111 Proben) **Tetrazyklin** detektiert werden (Bestimmbarkeitsgrenze 0,1 mg/kg). Bei Vergleichen mit der Literatur muss die Bestimmbarkeitsgrenze der jeweiligen Untersuchungsmethoden beachtet werden. Eine Bestimmbarkeitsgrenze von 0,8 mg/kg wie bei ENGELS (2004) hätte in der vorliegenden Untersuchung den Anteil der positiven Proben sowohl bei Chlortetrazyklin als auch bei Tetrazyklin auf ca. 13% reduziert. Ähnliches gilt für den Median bei Chlortetrazyklin, der unter dieser Annahme von 0,3 mg/kg auf 2,5 mg/kg ansteigen würde und damit in etwa halb so groß wie der von ENGELS (2004) ermittelte Wert von 4,8 mg/kg wäre. Dies zeigt den großen Einfluss der Bestimmbarkeitsgrenze auf den ermittelten Median (ähnliches gilt für das arithmetische Mittel), was bei dessen Bewertung bei Risikoabschätzungen zu beachten ist.

Die höchsten gemessenen Tetrazyklingehalte der Proben des Güllemonitorings lagen bei 50 mg/kg (Chlortetrazyklin). Diese Maximalgehalte stimmen mit den Untersuchungen von GRAFE (2000) und ENGELS (2004) überein.

Bei differenzierter Betrachtung zeigten sich Unterschiede vor allem in Abhängigkeit von der Größe der Betriebe. In Betrieben mit mehr als 220 Masttieren bzw. mehr als 45 Zuchtsauen lagen die Mediane der „Gesamt-Chlortetrazyklingehalte“ deutlich über denen der kleineren Betriebseinheiten. Auch im Anteil der negativen Befunde war über alle Betriebstypen ein Unterschied zwischen den großen und kleinen Betrieben zu erkennen, der bei den Mast- und Gemischtbetrieben signifikant war (Signifikanzniveau 0,1%). Dieser Unterschied ist eventuell durch den erhöhten Bedarf an Bestandsbehandlungen aus infektionsbiologischen Gründen (größere Tierzahlen erhöhen den Infektionsdruck) oder meta- bzw. prophylak-

tischen Einsätzen (z.B. Einstallprophylaxen) zu erklären. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Betriebstypen (Mast, Zucht, Gemischt) war dagegen nicht erkennbar.

Die Analyse der **Sulfonamidgehalte der Proben des Monitorings** ergab positive Nachweise für Sulfamethazin, -diazin, -merazin, -thiazol, -methoxazol und -dimethoxin, wobei die beiden erstgenannten Verbindungen die häufigsten waren. So konnte in 48% der Proben ein positiver Nachweis für Sulfamethazin ( $> 0,05$  mg/kg) erbracht werden, was auf den ersten Blick den Ergebnissen von ENGELS (2004) aus der Region Weser-Ems (49,3%) entspricht. Unter Berücksichtigung der dort erzielten Bestimmbarkeitsgrenze von 0,8 mg/kg ergäbe sich für die vorliegende Untersuchung allerdings lediglich ein Prozentsatz von 4,7% für die positiven Befunde. Der Median der Gehalte lag bei ENGELS (2004) bei 3,8 bzw. 4,3 mg SMT/kg. In der vorliegenden Untersuchung wurde ein Median von 0,12 mg SMT/kg bestimmt. Unter Berücksichtigung der höheren Bestimmbarkeitsgrenze läge er bei 1,6 mg/kg.

Der Konzentrationsbereich von bis zu 38 mg/kg war mit den Ergebnissen von HALLER et al. (2001) vergleichbar. ENGELS (2004) fand Maximalwerte von 235,1 bzw. 167,0 mg/kg. Resultate der Sulfonamidanalysen von GülLEN, die unmittelbar nach metaphylaktischer Behandlung gewonnen wurden, würden ebenfalls höhere Konzentrationen (Größenordnung: 160 mg/kg) in den Feldproben erwarten lassen. Die relativ geringen Gehalte könnten dadurch begründet sein, dass die Verschreibungshäufigkeit in den letzten Jahren u.a. auf Grund der hohen Stabilität der Sulfonamide reduziert wurde (HEINRITZI, 2005). Hierbei ist anzumerken, dass die Befunde auch Rückstände länger zurückliegender Behandlungen unter Berücksichtigung von Verdünnungseffekten darstellen können.

**Enrofloxacin und Florfenicol** konnten mit der gegebenen Bestimmbarkeitsgrenze (0,1 bzw. 0,05 mg/kg) in keiner Probe nachgewiesen werden. Bei Enrofloxacin kann der Grund hierfür in der mangelnden Persistenz gesehen werden. Diese wurde bereits mehrfach beschrieben (BAYERISCHES LANDESAMT FÜR WASSERWIRTSCHAFTSAMT, 2004; SCHLÜSENER et al., 2003; HALLER et al., 2002) und konnte auch in der vorliegenden Arbeit im Laborversuch bestätigt werden. Auch Florfenicol besitzt nur eine verminderte Stabilität und wird zudem in geringem Umfang angewandt, was sich u.a. mit der Applikationsart (intramuskulär) erklären lässt, da Injektionspräparate meist nur zur Einzeltierbehandlung eingesetzt werden. **Tiamulin** konnte lediglich in einer Probe in geringer Konzentration (0,5 mg/kg) gefunden werden. Diese Verbindung erwies sich zwar im Laborversuch als relativ stabil, wird jedoch selten eingesetzt. Auch bei SCHLÜSENER et al.

(2003) war die detektierte Menge nur sehr gering (0,05 mg/kg), was die Autoren mit Verdünnungseffekten begründen.

Bei der Betrachtung aller untersuchten Antibiotika sind die **Mehrfachbefunde** von besonderem Interesse. In zwei Proben konnten fünf, in 9 Proben vier der untersuchten Wirkstoffe nachgewiesen werden. 12,1% der Proben enthielten drei, 20% zwei Verbindungen. Dieses Ergebnis verdeutlicht nochmals sowohl die häufige Anwendung als auch die hohe Stabilität der Tetracycline und Sulfonamide. Bei Betrachtung von Betriebstyp und -größe ist auffällig, dass die 11 Proben mit Vier- bzw. Fünffachbefunden mit einer Ausnahme der Kategorie große Mastbetriebe (über 220 Masttiere) zuzuordnen waren, was wiederum für einen höheren Bedarf an Antibiotika in größeren Tierbeständen spricht.

Die Annahme, dass in der Winterperiode, in der vor allem Respirationskrankheiten häufiger auftreten, Antibiotika verstärkt eingesetzt werden, kann durch die Ergebnisse dieser Untersuchung bei **Betrachtung des Beprobungszeitraumes** unterstützt werden. So waren die relativen Anteile der Proben in den hohen Konzentrationsstufen im Frühjahr höher als im Herbst. Die kürzere Lagerungsdauer könnte ebenfalls ein Grund für die höheren Gehalte in diesen Proben sein.

Die möglichen **Antibiotikaeinträge bei der Ausbringung** der Gülle auf die landwirtschaftlichen Nutzflächen können durch drei Szenarien beschrieben werden.

Eine Düngung, entsprechend 170 kg Stickstoff (N) pro Hektar (z.B. 30 m<sup>3</sup>, N-Gehalt 5,7 kg/m<sup>3</sup>, 7,5% TS), würde unter Annahme der Bestimmbarkeitsgrenze von 0,1 mg/kg zu einem Eintrag von 3 g TC bzw. CTC/ha führen, was der Menge entspricht, die bei einer 3-tägigen Behandlung eines Läufers angewendet wird (50 kg KG; 20 mg CTC /kg KG, Tag). Der Median der positiven Proben von 0,3 mg/kg (CTC) bzw. 0,7 (TC) würde Frachten von 9 g CTC/ha bzw. 20,4 g TC/ha mit sich bringen. Der gemessene Maximalgehalt von 46 mg TC/kg (korrigiert um Wiederfindungsrate (70%): 59,8 mg/kg) würde zu 1,8 kg TC pro Hektar führen. Bei CTC läge dieser Wert bei 1,9 kg/ha (CTC max.: 50,0 mg/kg; korrigiert um Wiederfindungsrate (75%): 62,5 mg/kg). Nach Abzug des epimeren Anteils betrüge der Anteil an unverändertem Chlortetracyclin 0,8 kg/ha. Ergebnisse von ENGELS (2004), GRAFE (2000), FEUERPFIL et al. (1999) und LANGHAMMER (1989) bestätigen diese Größenordnung.

Die von Antibiotika-haltigen Gülle ausgehenden **Risiken** sind einerseits bezüglich einer Beeinflussung des Ökosystems „Boden“ zu betrachten, andererseits bezüglich der Entstehung und Verbreitung resistenter Bakterien.

Was das **Ökosystem „Boden“** betrifft, so ist eine Beeinflussung der mikrobiellen Diversität durch hohe Antibiotikafrachten nicht auszuschließen. So wurde in einer dänischen Studie eine Zunahme Tetrazyklin-resistenter Bakterien im Boden nach einer Düngung mit Schweinegülle beobachtet (SENGELØV et al., 2003). Nicht unerwähnt soll in diesem Zusammenhang bleiben, dass Hinweise auf einen möglichen Carry-over von Antibiotika aus dem Boden in pflanzliche Lebensmittel existieren (BETSCHKE et al., 2004).

Bei der Beurteilung der gemessenen Antibiotikagehalte hinsichtlich der **Resistenzproblematik** bietet sich die Einteilung der aufsummierten Tetrazyklinwerte (Tetrazyklin und Chlortetrazyklin) in Konzentrationsklassen an, die in Anlehnung an die Empfindlichkeitsprädiatklassen der MHK-Werte für Tetrazykline (DIN 58940-4-Beiblatt 1:2004-02) vorgenommen wurde (Tabelle 34).

Tabelle 34: Einteilung der Tetrazyklinbefunde (Summe von TC und CTC) in Schweinegülle (N = 380) in Konzentrationsklassen nach DIN 58940

Konzentrationsklassen Summe CTC+TC [mg/kg]	Befunde [%]	korrigierte Befunde* [%]	Antibakterielle Wirkung
< 0,1	48,9	48,9	subinhibitorisch
0,1 - 1,0	28,2	31,6	
1,0 - 4,0	13,2	13,2	intermediär
≥ 4,0	9,7	6,3	inhibitorisch

\*Gesamt-CTC korrigiert um -60% (= Epimer)

Dabei ist festzustellen, dass 9,7% der Proben Gehalte ( $\geq 4$  mg/kg) aufwiesen, die zur **Selektion** von Tetrazyklin-resistent einzustufenden Bakterien geeignet sind (KAYSER et al.; 2001; FEUERPFIL et al., 1999). Selbst bei Korrektur der Chlortetrazyklinbefunde auf den aktiven Anteil lag dieser Prozentsatz noch bei 6,3. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Verschiebung des Verhältnisses von sensiblen zu resistenten Keimen in erste Linie im Gastrointestinaltrakt der Tiere stattfindet, da dort die Wachstumsbedingungen für viele Mikroorganismen außerordentlich günstig sind. Während der Güllelagerung dürfte Selektionswirkung bei den Tetrazyklinen nur bedingt greifen, da diese bakteriostatisch wirken. Dies

bedeutet, dass sensible Keime nicht abgetötet werden. Eine Überwucherung mit resistenten Keimen ist deshalb kaum zu erwarten. Dies um so mehr, als dass sich die Mikroorganismenpopulation in der gelagerten Gülle bereits in der Plateau- bzw. Absterbephase befinden (GHALY et al., 1989). Diese „Selbsthygienisierung“ der Gülle (STRAUCH & BALLARINI, 1994) wirkt in gewisser Weise einer Gefährdung entgegen.

13,2% der Güllen wiesen Tetrazyklinkonzentrationen (1,0 bis 4,0 mg/kg) auf, die das Wachstum intermediär einzustufender Bakterien erlauben. Auch diese Konzentrationen sind als kritisch zu betrachten, da sie ebenfalls, wenn auch in geringem Umfang, den Austausch von Plasmiden und Transposons auslösen können (CORPET et al., 1989; DOUCET-POPULAIRE et al., 1991; OHLSEN et al., 2003). Des Weiteren fördern diese geringen Antibiotikagehalte niedrig-resistente Populationen gegenüber der sensiblen Flora, was durch Adaptionsprozesse an steigende Konzentrationen zu hohen Resistenzlevels einzelner Keime führen kann (GEORGE & LEVY, 1983; MITTLER & LENSKI, 1992; BAQUERO et al., 1997).

Auch Konzentrationen zwischen 0,1 und 1,0 mg/kg sind nicht von vornherein als unproblematisch einzustufen. Untersuchungen von BURGHARD (2006) ergaben, dass Güllen mit derartigen Tetrazyklingehalten signifikant mehr Tetrazyklin-Gene (TetM, TetO) enthalten, als Güllen deren Tetrazyklinkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze lag.



## F Zusammenfassung

Durch die medikamentöse Behandlung von Nutztieren werden Antibiotika unverändert oder in metabolisierter Form via Harn und Kot ausgeschieden. Eine Bewertung eines daraus resultierenden Risikos bezüglich der Bildung und Verbreitung antibiotika-resistenter Bakterienpopulationen in der Umwelt kann nur vorgenommen werden, wenn qualitative und quantitative Informationen über Antibiotikarückstände in der Gülle vorliegen. Da es zum Vorkommen von Antibiotika in Wirtschaftsdüngern bisher nur wenige Untersuchungen gab, wurden in dieser Arbeit sensible und robuste Analysemethoden zum Nachweis umweltrelevanter Antibiotika entwickelt und ein bayernweites Monitoring von Schweinegülle durchgeführt.

Die zwei entwickelten LC-MS-Methoden erfassen folgende 23 Antibiotika: Tetracyclin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Doxyzyclin, Sulfadiazin, -methazin, -thiazol, -methoxazol, -guanidin, -merazin, -dimethoxin, -chloropyridazin, -methoxypyrazin, -meter, -doxin, -phenazol, -isomedin, -pyridin, N4-Acetyl-Sulfamethazin, Trimethoprim, Enrofloxacin, Florfenicol und Tiamulin. Das Prinzip der Methoden beruht auf einer Flüssig-Flüssigextraktion in Kombination mit einer Festphasenextraktion. Im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 mg/kg bzw. 0,05 mg/kg (Bestimmbarkeitsgrenzen) und 200 mg/kg wurden Wiederfindungsraten zwischen 60 und 110% erreicht.

Zur Untersuchung der Stabilität der untersuchten Verbindungen in Gülle wurden praxisnahe Lagerungsversuche bei 7°C durchgeführt. Bei Chlortetracyclin konnte nach einer 6-monatigen Lagerung kein Abbau beobachtet werden. Sulfadiazin wurde in der ersten Woche um 50% reduziert; in der folgenden Lagerungszeit (bis zu 32 Wochen) war keine weitere Konzentrationsabnahme festzustellen. Trimethoprim wurde hingegen innerhalb von zwei Wochen vollständig abgebaut.

In einem weiteren Lagerungsversuch im Labormaßstab wurde das Verhalten von 13 Sulfonamiden bei verschiedenen Temperaturen (-20°C, 7°C, Raumtemperatur) über einen Zeitraum von 16 Wochen untersucht. Hierbei zeigten Sulfamerazin, Sulfamethoxypyrazin, Sulfaguanidin und Sulfisomedin im Beobachtungszeitraum keinen Abbau, während Sulfamethoxazol sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 7°C eine Konzentrationsabnahme um bis zu 80% festzustellen war. Diese Reduktion fand bei höheren Temperaturen schneller statt. Enrofloxacin und Florfenicol wurden ab einer Lagertemperatur von 7°C innerhalb von 16 Wochen um bis zu 80% abgebaut. Tiamulin hingegen wies eine höhere Stabilität auf und wurde im Versuchszeitraum bei 7°C um 10%, bei Raumtemperatur um 25% reduziert. Eine

Probenlagerungstemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  führte lediglich bei Sulfachloropyridazin und Enrofloxacin zu einer geringern Konzentrationsminderung.

In einem bayernweiten Güllemonitoring wurden 380 Güllen von schweinehaltenden Betrieben mit den entwickelten Methoden analysiert. In 29,5% der Proben konnte keine der untersuchten Verbindungen nachgewiesen werden; in 70,5% wurde mindestens ein Antibiotikum detektiert. In zwei Proben konnten 5, in neun Proben 4 der untersuchten Wirkstoffe gefunden werden.

37% der untersuchten Proben enthielten Chlortetrazyklin, 29% Tetrazyklin, jeweils in Konzentrationen bis zu 50 mg/kg. Bei der Sulfonamidanalyse konnte in 48% der Proben Sulfamethazin (0,05 - 38 mg/kg) gemessen werden. Sulfadiazin wurde in 19 Proben (5%) nachgewiesen. Positive Befunde, wenn auch zahlen- und mengenmäßig in nur geringem Umfang, wurden auch für Oxytetrazyklin, Sulfamerazin, Sulfathiazol, Sulfamethoxazol, Sulfathiazol und Tiamulin bestimmt.

6,3 bzw. 13,2% der Güllen wiesen Tetrazyklinkonzentrationen auf, die zur Selektion von resistent bzw. intermediär einzustufenden Bakterien geeignet sind.

Unter Berücksichtigung der Herkunft der Proben ist festzustellen, dass der prozentuale Anteil der Befunde in den höheren Gehaltsklassen ( $\geq 4$  mg/kg) bei den größeren Betrieben (mehr als 220 Masttiere bzw. mehr als 45 Zuchtsauen) höher war; zudem wiesen sie einen geringen Anteil an negativen Befunden (unterhalb der Bestimmbarkeitsgrenze) auf. Auffällig war auch, dass in den im Frühjahr gewonnen Proben häufiger höhere Konzentrationen festzustellen waren, als dies bei der Herbstbeprobung der Fall war.

Auf Grund der erzielten Resultate sind Antibiotikaeinträge durch Düngung im folgenden Rahmen zu erwarten. Tetrazyklinkonzentrationen im Bereich der Bestimmbarkeitsgrenze ergäben 3 g/ha, der gemessene Höchstgehalt würde zu 1,8 kg/ha führen.



## G Summary

In the therapy of livestock unchanged or metabolized antibiotics are excreted. Risk assessment regarding the rise of and spread of antibiotic resistant bacteria-population in the environment needs qualitative and quantitative information about antibiotic residues in manure. Up to now, there was only little research into the occurrence of antibiotics in liquid manure. Therefore, a sensitive and robust method for the analysis of possible residues was established. Furthermore pig manure samples from Bavarian farms were collected and analyzed.

Two LC-MS methods were developed to analyse 23 of the most relevant antibiotics with LC-MS techniques. With these methods following substances can be detected: tetracycline, chlortetracycline, oxytetracycline, doxycycline, sulphadiazine, -methazine, -thiazole, -methoxazole, -guanidine, -merazine, -dimethoxine, -chloropyridazine, -methoxypyrazine, -meter, -doxine, -phenazole, -isomedine, N4-acetylated-sulfamethazine, trimethoprim, enrofloxacin, florfenicol and tiamulin. The methods based on a liquid-liquid-extraction followed by solid phase extraction. In the range of concentrations from 0.1 mg/kg or 0.05 mg/kg up to 200 mg/kg, recovery rates of 60 to 110% were achieved.

In a trial to examine the stability of pharmaceuticals in manure during storage (storage temperature 7°C) there was no degradation of chlortetracycline during the term of six months. Sulphadiazine was reduced to 50% after one week, but the remaining residuals were stable until the end of the trial (32 weeks). Trimethoprim was degraded completely within two weeks. In another experiment with three different storage temperatures (-20°C, 7°C, room temperature) over a period of 16 weeks all examined sulphonamides were studied. Sulphamerazine, sulphamethoxypyrazine, sulphaguanidine and sulphisomedine persisted. Sulphamethoxazole was reduced up to 80% at 7°C as well as at room temperature. The same degradation rate was reached more quickly with higher temperatures than under cooler conditions of storage. Enrofloxacin and tiamulin were reduced to 20% within 16 weeks at 7°C storage temperature. Tiamulin was more stable; a reduction of 10% at 7°C, 25% at room temperature could be observed. Only sulphapyridazine and enrofloxacin showed a small decline at a storage temperature of -20°C.

In a monitoring 380 pig manure samples from Bavarian farms were collected and analyzed. In 29.5% of the samples none of the examined antibiotics could be detected. 70.5% contained at least one antibiotic substance. In two samples 5, in

nine 4 antibiotics could be analyzed. The analysis showed positive findings for chlortetracycline (37%) and tetracycline (29%) in concentrations up to 50 mg/kg. In 48% of the field samples sulphamethazine was detected (0.05 - 38 mg/kg). Sulphadiazine was analysed in 19 samples (5%). Oxytetracycline, sulphamerazine, sulphathiazole and tiamuline were also detected but only in few samples and in lower concentrations.

6.3% or 13.2% of the manure samples contained tetracycline concentrations which could lead to selection of bacteria classified as resistant or intermediate, respectively.

Regarding the type of farming (breeding or fattening farms) or the farm size (large or small) it could be determined that the percentage of findings with high concentrations ( $\geq 4$  mg/kg) was higher in large scale farms (more than 220 porker/more than 45 sows) than in smaller ones. Furthermore it was notable that samples which were acquired in spring showed a higher percentage of high residues, than those collected in autumn.

The results showed that following charges could be expected by the application of manure. Concentrations of tetracycline in the range limit of determination would lead to 3 g/ha; the detected maximum to 1.8 kg/ha.

## H Literaturverzeichnis

- BAQUERO, F.; M. NEGRI; M. MOROSINI; J. BLÁZQUEZ; 1997  
In: Antibiotic resistance: Origin, evolution and spread, Wiley, Chichester
- BAYERISCHES LANDESAMT FÜR WASSERWIRTSCHAFT; 2004  
Arzneimittel in der Umwelt. Forschungs- und Entwicklungsvorhaben 2000-2002, Materialien Nr. 114
- BERGER, K.; B. PETERSEN; H. BÜNING-PFAUE; 1986  
Persistenz von Gülle-Arzneistoffen in der Nahrungsmittelkette. Archiv für Lebensmittelhygiene, 37, 99-102
- BETSCHKE, T.; C. SCHWAKE-ANDUSCHUS; G. LANGENKÄMPER; E. NETTMANN; M. GROTE; 2004  
Können Veterinär-Antibiotika in pflanzliche Lebensmittel gelangen? In: Jahresbericht 2004 der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BfEL), [http://www.bfa-ernaehrung.de/bfel\\_jb\\_2004.pdf](http://www.bfa-ernaehrung.de/bfel_jb_2004.pdf)
- BfT (Bundesverband für Tiergesundheit, e.V.); 2005  
Arzneimittel in der Umwelt. Tiergesundheit – Berichte aus der Tiergesundheitsindustrie in Europa. Ausgabe 47/Februar 2005
- BLAHA, T.; 1996  
Gesundheits- und Umweltrisiken von Antiinfektiva und Antiparasitika in der Nutztierhaltung – Vermeidungsstrategien und Auswege. Deutsche tierärztliche Wochenschrift, 103, 278-280
- BJÖRGLUND, H.; J. BONDESTAM; G. BYLUND; 1990  
Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms. Aquaculture, 86, 359-367
- BOXALL, A.; P. BLACKWELL; R. CAVALLO; P. KAY; J. TOLLS; 2002  
The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. Toxicological letters, 131, 19-28
- BOXALL, A.; D. KOLPIN; B. HALLING-SØRENSEN; J. TOLLS; 2003  
Are veterinary medicines causing environmental risks? Environmental Science and technology, 37(15) 286A-294A
- BOXALL, A.; L. FOGG; P. BLACKWELL; P. KAY; E. PEMBERTON; A. CROXFORD; 2004  
Veterinary medicines in the environment. Reviews of environmental contaminants and toxicology, 180, 1-91
- BÖHM, R.; 1996  
Auswirkungen von Rückständen von Antiinfektiva in tierischen Ausscheidungen auf die Güllebehandlung und den Boden. Deutsche tierärztliche Wochenschrift, 103, 237-268
- BURGHARD, C.; 2006  
Antibiotika resistente Bakterien und Tetrazyklin-Resistenzgene in Schweinegülle. Ludwig-Maximilian-Universität München, Dissertation

- CAMPAGNOLO, R.; K. JOHNSON; A. KARPATI; C. RUBIN; D. KOLPIN; M. MEYER; J. ESTEBAN; C. CURRIER; K. SMITH; K. THUG; M. MCGEEHIN; 2002  
Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. *Journal of the total environment*, 299, 89-95
- CHRISTIAN, T.; R. SCHNEIDER; H. FÄBER; D. SKUTLAREK; M. MEYER; H. GOLDBACH; 2003  
Determination of antibiotics residues in manure, soil and surface waters. *Acta hydrochimica hydrobiologia*, 31(1), 36-44
- CORPET, D.; S. LUMEAU; F. CORPET; 1989  
Minimum antibiotic levels for selecting a resistance plasmid in a gnotobiotic animal model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 33(4), 535-540
- DAUGHTON C. & T. TERNES; 1999  
Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? *Environmental Health Perspectives*, 107, 907-938
- DE LIGUORO, M.; V. CIBIN; F. CAPOLONGO; B. HALLING-SØRENSEN; C. MONTESISSA; 2003  
Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil. *Chemosphere*, 52, 203-212
- DÍAZ-CRUZ, S.; M. LÓPEZ DE ALDA; D. BARCELÓ; 2003  
Environmental behaviour and analysis of veterinary and human drugs in soil, sediments and sludge. *Trends in analytical chemistry*, 22(6), 340-351
- DIN (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG E.V.); 2004  
Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika. Teil 4: Bewertungsstufen der minimalen Hemmkonzentration von antimikrobiellen Wirkstoffen. DIN 58940-4, Bleibblatt 1, Beuth Verlag, Berlin
- DOUCET-POPULAIRE, F.; P. TRIEU-CUOT; I. DOSBAA; A. ANDREMONT; P. COURVALIN; 1991  
Inductible transfer of conjugative transposons Tn1545 from *Enterococcus faecalis* to *Listeria monocytogenes* in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35(1), 185-187
- DÜRCKHEIMER, W.; 1975  
Tetrazykline: Chemie, Biochemie und Struktur-Wirkungs-Beziehungen. *Angewandte Chemie*, 21, 751-784
- EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products); 1997  
Note for guidance: Environmental risk assessment for veterinary medicinal products other than GMO-containing and immunological products. Committee for veterinary and medical product (CMVP)
- EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products); 2000  
Guideline on the environmental impact assessment for veterinary medicinal products. CVMP/VICH/592/98
- ENGELS, H.; 2004  
Verhalten von ausgewählten Tetrazyklinen und Sulfonamiden in Wirtschaftsdüngern und in Böden. Georg-August-Universität Göttingen, Dissertation

- FEDESA; 1999  
Antibiotics for animals – A FEDESA perspective on antibiotics, animal health and the resistance debate. <http://www.fedesa.be> bzw. <http://www.ifahsec.org>  
<http://www.ifahsec.org/europe/topics/antibio/pdf/Dossier9.pdf>
- FEUERPFIL, I.; J. LÓPEZ-PILA; R. SCHMIDT; E. SCHNEIDER; R. SZEWZYK; 1999  
Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt. Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung und -schutz, 42, 37-50
- FORTH, W.; D. HENSCHLER; W. RUMMEL; T. ZURMÜHL; 2001  
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 6. Auflage, Wissenschaftsverlag, Mannheim, 899 S.
- GHALY, A.; R. KOK; J. INGRAHM; 1989  
Growth rate determination of heterogeneous microbial population in swine manure. Applied biochemical biotechnology, 22(1), 59-78
- GAVALCHIN, J. & S. KATZ; 1994  
The persistence of fecal-born antibiotics in soil. Journal of the AOAC international, Vol. 77(2), 481-485
- GEORGE, A. & S. LEVY; 1983  
Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol and other antibiotics in *Escherichia coli*: Involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline. Journal of bacteriology, 155(2), 531-540
- GRAFE, A.; 2000  
Untersuchungen zum Einsatz pharmakologisch wirksamer Stoffe in der Veredelungswirtschaft unter besonderer Berücksichtigung der Tetrazykline. Georg-August-Universität, Dissertation
- GRÄFE, U; 1992  
Biochemie der Antibiotika: Struktur – Biosynthese – Wirkungsmechanismus, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- GROTE, M.; A. VOCKEL; D. SCHWARZE; A. MEHLICH; M. FREITAG; 2004  
Fate of antibiotics in food chain and environment originating from pigfattening. Fresenius environmental bulletin, 13(11b), 1216-1224
- GÖBEL, A.; C. MCARDELL; M. SUTER; W. GIGER; 2004  
Trace determination of macrolide and sulfonamide antimicrobials, a human sulfonamide metabolite, and trimethoprim in wastewater using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. Analytical chemistry, 76, 4756-4764
- HALLER, M.; S. MÜLLER; K. STOOB; C. MCARDELL; 2001  
Antibiotika in Hofdünger – Analytik und erste Resultate. Jahresbericht der EAWAG, Schweiz, 33-34
- HALLER, M.; S. MÜLLER; C. MCARDELL; C. ALDER; M. SUTER; 2002  
Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of chromatography A, 952, 111-120

- HALLING-SØRENSEN, B.; S. NIELSEN; P. LANZKY; F. INGERLEV; H. LÜTZHØFT; S. JØRGENSEN; 1998  
Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere*, 36(2), 357-393
- HALLING-SØRENSEN, B.; S. NIELSEN; J. JENSEN; J. TJØRNELUND; M. MONTFORTS; 2001  
Worst-case estimations of predicted environmental soil concentrations (PEC) of selected veterinary antibiotics and residues used in Danish agriculture. In KÜMMERER, K. (2001), *Pharmaceuticals in the environment – sources, fate, effects and risks*. Springer Verlag, Berlin, 143-156
- HALLING-SØRENSEN, B.; G. SENGELOV; J. TJØRNELUND; 2002  
Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Archives of Environmental Contaminants and Toxicology*, 42, 263-271
- HAMSCHER, G.; S. SCZESNY; A. ABU-QARE; H. HÖPER; H. NAU; 2000a  
Stoffe mit pharmakologischer Wirkung einschließlich hormonell aktiver Substanzen in der Umwelt: Nachweis von Tetracyclinen in güllegedüngten Böden. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 107(8), 293-348
- HAMSCHER, G.; S. SCZESNY; H. HÖPER; H. NAU; 2000b  
Tetracyclin- und Chlortetracyclinrückstände in güllegedüngten Böden. In: HARTUNG, J. & C. WATHES (2000) (eds.) *Livestock farming and the environment*, Sonderheft 226. Braunschweig, 27-31
- HAMSCHER, G.; S. SCZESNY; H. HÖPER; H. NAU; 2002  
Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74, 1509-1518
- HARTIG, C.; 2000  
Analytik, Vorkommen und Verhalten aromatischer Sulfonamide in der aquatischen Umwelt. Technische Universität Berlin, Dissertation
- HEBERER, T.; 2002  
Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data. *Toxicology letters*, 131, 5-17
- HEBERER, T. & H. STAN; 1998  
Arzneimittelrückstände im aquatischen System. *Wasser & Boden*, 50, 20-25
- HEINRITZI, K; 2005  
Mündliche Mitteilung
- HIRSCH, R.; T. TERNES; K. HABERER; A. MEHLICH; F. BALLWANZ; K. KRATZ; 1998  
Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 815, 213-223
- HIRSCH, R.; T. TERNES; K. HABERER; K. KRATZ; 1999  
Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The science of the total environment*, 225, 109-118

- HÖPER, H.; J. KUES; G. HAMSCHER; S. SCZESNY; H. NAU; 2001  
Nachweis von Tierarzneimitteln in güllegedüngten Böden. VDLUFA-Schriftenreihe, 57(Teil 2), 747-752
- HÖPER, H.; J. KUES; H. NAU; G. HAMSCHER; 2002  
Eintrag und Verbleib von Tierarzneimittelwirkstoffen in Böden. Bodenschutz, 4, 141-148
- INGERSLEV, F.; L. TORÅNG; M. LOKE; B. HALLING-SØRENSEN; N. NYHOLM; 2001a  
Primary biodegradation of veterinary antibiotics in aerobic and anaerobic surface water simulation systems. Chemosphere, 44, 865-872
- INGERSLEV, F. & B. HALLING-SØRENSEN; 2001b  
Biodegradability of metronidazole, olaquinox and tylosin and formation of tylosin degradation products in aerobic soil-manure slurries. Ecotoxicology and environmental safety, 48, 311-320
- JAKOBSEN, A.; B. HALLING-SØRENSEN; F. INGERLEV; S. HANSEN; 2004  
Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of chromatography A, 1038, 157-170
- JACOBSEN, P. & L. BERGLIND; 1988  
Persistence of oxytetracycline in sediment from fish farm. Aquaculture, 70, 365-370
- JØRGENSEN, S. & B. HALLING-SØRENSEN; 2000  
Drugs in the environment. Chemosphere 40, 691-699
- KAY, P.; P. BLACKWELL; A. BOXALL; 2004  
Fate of veterinary antibiotics in a macroporous tile drained clay soil. Environmental Toxicology and Chemistry, 23 (5), 1136-1144
- KAYSER, F.H.; K. BIENZ; J. ECKERT; R. ZINKERNAGEL; 2001  
Medizinische Mikrobiologie. 10. Auflage , Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 727 S.
- KENNEDY, D.; R. MCCRACKEN; S. HEWITT; J. MCENVOY; 1998a  
Metabolism of chlortetracycline: Drug accumulation and excretion in the hen's egg. The analyst, 123, 2443-2447
- KENNEDY, D.; R. MCCRACKEN; M. CAREY; W. BLANCHFLOWER; S. HEWITT; 1998b  
Iso- and epi-iso-chlortetracycline are the principal metabolites of chlortetracycline in the hen's egg. Journal of chromatography A, 812, 327-337
- KOLPIN, D.; E. FURLONG; M. MEYER; E. THURMAN; S. ZAUG; L. BARBER; H. BUXTON; 2002  
Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in US streams 1999-2000. Environmental science and technology, 36, 1202-1211
- KROKER, R.; 1983  
Aspekte zur Ausscheidung antimikrobiell wirksamer Substanzen nach der chemotherapeutischen Behandlung von Nutztieren. Wissenschaft und Umwelt, 4, 305-309

- KROKER, R.; W. LÖSCHER; J. SIMUNEK; H. TROLLDENIER; F. UNGEMACH; 1996  
Chemotherapie bakterieller Infektionen. In: FREY, H.H. & W. LÖSCHER, (Hrsg.): Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Enke, Stuttgart, 454-508
- KROKER, R.; 2002  
Kompaktwissen Tierarzneimittelrückstände. 1. Auflage, Behr's Verlag, Berlin, 108 S.
- KÜHNE, M.; D. IHNEN; D. MÖLLER; O. AGTHE; 2000  
Stability of tetracycline in water und liquid manure. Journal of veterinary medicine A, 47, 379-384
- KÜMMERER, K.; 2001  
Pharmaceuticals in the environment – sources, fate, effects and risks. Springer Verlag, Berlin
- KÜMMERER, K; 2003  
Significance of antibiotics in the environment. Journal of antimicrobial chemotherapy, 52, 5-7
- LAI, H.; S. LIU; Y. CHIEN; 1995  
Transformation of chloramphenicol and oxytetracycline in aquaculture pond sediments. Journal of environmental science and health A, 30, 1897-1923
- LANGHAMMER, J.-P.; 1989  
Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe als Rückstände in Gülle und im landwirtschaftlichen Umfeld. Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Dissertation. 138 S.
- LINDSEY, M.; M. MEYER; E. THURMAN; 2001  
Analysis of trace levels of sulphonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. Analytical chemistry, 73, 4640-4646
- LfL SCHRIFTENREIHE; 2003  
Konzept zur Minderung des Einsatzes von Antibiotika und antibiotischen Leistungsförderern in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung. 7/2003, 77 S.
- LÖFFLER, D. & T. TERNES; 2003  
Analytical method for the determination of the aminoglycoside gentamicin in hospital water via liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. Journal of chromatography A, 1000, 583-588
- LOKE, M.; F. INGERSLEV; B. Halling-SØRENSEN; J. TJØRNELUND; 2000  
Stability of tylosin A in manure containing test systems determined by high-performance liquid chromatography. Chemosphere, 40, 759-765
- LÖSCHER, W. & F.R. UNGEMACH & R. KROKER; 2002  
Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. 6. Auflage, Parey Blackwell Wissenschafts-Verlag, 540 S.
- MARZO, A. & L. DAL BO; 1998  
Review: Chromatography as an analytical tool for selected antibiotica classes: A reappraisal addressed to pharmacokinetic applications. Journal of chromatography A, 812, 17-34



- MCARDELL, C; A. ALDER; E. GOLET; E. MOLNAR; N. NIPALES; W. GIGER; 2003  
Antibiotika: Kehrseite der Medaille. EAWAG News, 53, 21-23
- MEYER, M.; J. BUMGARNER; J. VARNIS; J. DAUGHTRIDGE; E. THURMAN; K. HOSTETLER; 2000  
Use of radioimmunoassay as a screen for antibiotics in confined feeding operations and confirmation by liquid chromatography-mass spectrometry. The science of the total environment, 248, 181-187
- MICROMEDEX MONOGRAPHS; 2003  
Veterinary Drug Information. The United States Pharmacopeial (USP) convention Inc., <http://www.usp.org/pdf/veterinary>
- MIGLIORE, L.; G. BRAMBILLA; S. COZZOLONO; L. GAUDIO; 1995  
Effect on plants of sulphadimethoxin used in intensive farming. Agriculture, ecosystems and environment, 52, 103-110
- MITTLER J. & R. LENSKI; 1992  
Experimental evidence for an alternative to directed mutation in the bgl operon. Nature, 356(6368), 446-448
- OHLSSEN, K.; T. TERNES; G. WERNER; U. WALLNER; D. LÖFFLER; W. ZIEBUHR; W. WITTE; J. HACKER; 2003  
Impact of antibiotics on conjugational resistance gene transfer in *Staphylococcus aureus* in sewage. Environmental microbiology, 5(8), 711-716
- OKA, H.; H. NAKAZAWA; K. HARADA; J. MACNEIL; (editors) 1995  
Chemical analysis for antibiotics used in agriculture. AOAC International
- PARFITT, K. (editor); 1999  
Martindale: The complete drug reference. London, Pharmaceutical Press
- PAULSON, G.; J. GIDDINGS; C. LAMOUREUX; E. MANSAGER; C. STRUBLE; 1980  
The isolation and identification of <sup>14</sup>C-sulfamethazine {4-amino-N-(4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl)[<sup>14</sup>C]benzenesulfoamide} metabolites in the tissues and excreta of swine. Drug metabolism and disposition, 9(2), 142-146
- PFEIFER, T.; J. TUERK; K. BESTER; M. SPITELLER; 2002  
Determination of selected sulfonamide antibiotics and trimethoprim in manure by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. Rapid communications in mass spectrometry, 16, 663-669
- PSCHYREMBEL, 1986  
Klinisches Wörterbuch mit klinischen Syndromen und Nomina anatomica, 255. Auflage, De Gruyter, Berlin, 1873 S.
- RASSOW D. & H. SCHAPER; 1996  
Zum Einsatz von Fütterungsarzneimitteln in Schweine- und Geflügelbeständen in der Region Weser-Ems. Deutsche tierärztliche Wochenschrift, 103(7), 237-284
- RICHARDSON, M. & J. BROWN; 1995  
The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. Journal of pharmaceuticals & pharmacology, 37, 1-12
- RÖMPP; 1995  
Chemie Lexikon, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

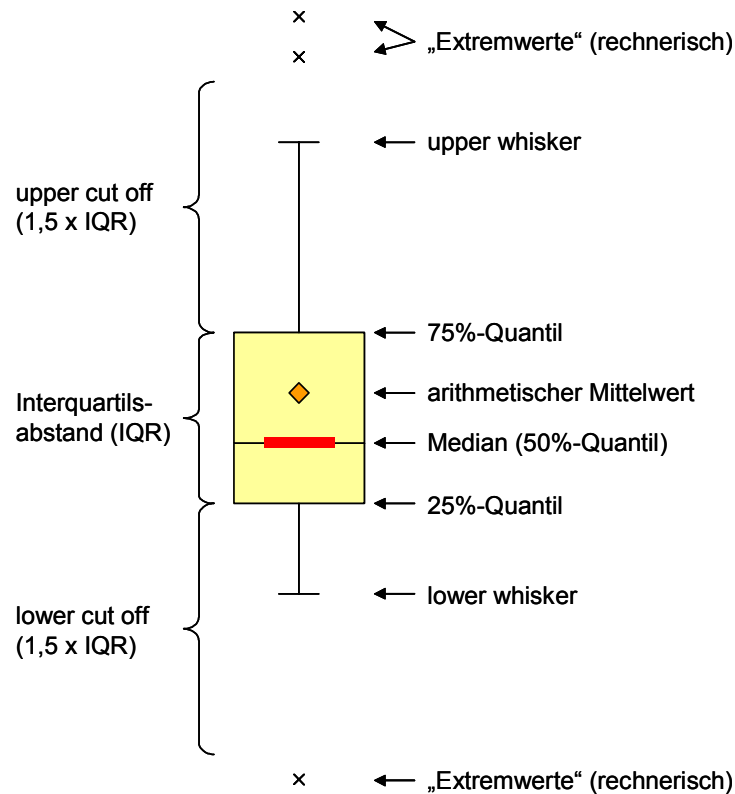
- SACHER, F.; F. LANGE; H. BRAUCH; I. BLANKENHORN; 2001  
Pharmaceuticals in groundwaters – Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *Journal of chromatography A*, 938, 199-210
- SAMS, R.; 1995  
Florfenicol: Chemie und Metabolismus eines neuen Breitspektrum-Antibiotikums. *Tierärztliche Umschau*, 50, 703-707
- SCHADEWINKEL-SCHERKEL, A. & R. SCHERKL; 1995  
Antibiotika und Chemotherapeutika in der tierärztlichen Praxis. Gustav Fischer, Jena, Stuttgart, 153 S.
- SCHEDL, D.; 2000  
Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit von Chlortetracyclin, Doxycyclin, Oxytetracyclin und Tetracyclin gegenüber humaner Darmflora und zur Resistenzbildung bei *E. coli* durch Anhydrotetracyclin und 4-epi-Tetracyclin. Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation
- SCHLÜSENER, M.; K. BESTER; M. SPITELLER; 2003  
Determination of antibiotics such as macrolides, ionophores and tiamulin in liquid manure by HPLC-MS/MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 375, 942-947
- SCHWAB, M. & H. DÖHLER; 2000  
Wirtschaftsdüngeranfall. *Landtechnik*, 55, 189-190
- SCHWARZ, S.; C. KEHRENBURG; T.R. WALSH; 2000  
Review: Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International journal of antimicrobial agents*, 17, 431-437
- SCZESNY, S.; 2001  
Analytik von Tetracyclinen in Umwelt- und Lebensmittelproben mittels selektiver Extraktionsverfahren und sensitiven Nachweis durch HPLC gekoppelt mit mikrobiologischem Assay und Tandem Massenspektrometrie. Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation
- SENGELØV, G.; Y. AGERSØ; B. HALLING-SØRENSEN; S. BALODA; J. ANDERSEN; L. JENSEN; 2003  
Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environment International*, 28, 587-595
- STOLKER, A.; W. NIESING; E. HOGENDOORN; J. VERSTEEGH; R. FUCHS; U. BRINKAN; 2004  
Liquid chromatography with triple-quadrupole or quadrupole-time of flight mass spectrometry for screening and confirmation of residues of pharmaceuticals in water. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378, 955-963
- STRAUCH, D. & G. BALLERINI; 1994  
Hygienic aspects of the production and agricultural use of animal wastes. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B*, 41(3), 176-228
- THIELE-BRUHN, S.; 2003  
Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *Journal of plant nutrition and soil science*, 166, 145-167

- THIELE-BRUHN, S.; T. SEIBICKE; H. SCHULTEN; P. LEINWEBER; 2004  
Sorption of sulphonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. *Journal of environmental quality*, 33, 1331-1342
- TOLLS, J.; 2001  
Review: Sorption of veterinary pharmaceuticals. *Environmental science and technology*, 35(17), 3397-3406
- VREE, T.B.; E.W. BENEKEN KOLMER; A. PEETERS; 1991  
Cpmparison of metabolism of four sulphonamides between humans and pigs. *Veterinary Quarterly*, 13, 236-240
- WARMAN, P. & R. THOMAS; 1981  
Chlortetracycline in soil amended with poultry manure. *Canadian journal of soil science*, 61, 161-163
- WINCKLER, C. & A. GRAFE; 2000  
Stoffeintrag durch Tierarzneimittel und pharmakologische Futterzusatzstoffe unter besonderer Berücksichtigung der Tetrazykline. UBA Texte 44/00
- WINCKLER, C. & A. GRAFE; 2001  
Use of veterinary drugs in intensive animal production – evidence for persistence of tetracycline in pig slurry. *Journal of soils and sediments*, 1(2), 66-70
- UNGEMACH, F.; 2000  
Figures on quantities of antibacterials used for different purposes in the EU countries and interpretation. *Acta agriculturæ scandinavica supply* 93, 89-97
- WEIDENBERG, E.; 2002  
Vergleich verschiedener Aufschlussverfahren zur Herstellung von Gelatine aus Knochen im Hinblick auf Rückstände von Tetrazyklinen. Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation
- XIU-SHENG; M.; F. BISHAY; M. CHEN; C. METCALFE; 2004  
Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Environmental science and technology*, 38 , 3533-3541
- ZHU, J.; D. SNOW; D. CASSADA; S. MONSON; R. SPALDING; 2001  
Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 928, 177-186
- ZURHELLE, G.; 2000  
Entwicklung und Anwendung einer automatisierten HPLC-Methode mit gekoppelter online Dialyse: Metabolismus, Verteilung und Elimination dreier Tetrazykline bei Legehennen. Bergische Universität - Gesamthochschule Wuppertal, Dissertation



## I Anhang

### Erklärung einer Boxplot-Darstellung



### Herstellung von N4-acetylierten Sulfonamid-Metaboliten (nach PFEIFFER et al. (2002))

- Einwaage von 100 mg Sulfonamid, in 6,25 ml Pyridin lösen
- Zugabe von 0,5 ml Essigsäureanhydrid
- Wasserbad bei 80°C für 2 Stunden
- Zugabe von 1,25 ml NH<sub>4</sub>-Lösung und 1,25 ml Reinstwasser
- Bei Raumtemperatur 30 Minuten stehen lassen
- Ansäuerung auf pH 2 mit Salzsäure (25%)
- Ausschütteln der Lösung im Schütteltrichter mit 50 ml Ethylacetat (zweimal)
- Ethylacetatphasen im Schütteltrichter vereinigen und mit 0,1% Essigsäure (50 ml) ausschütteln
- Wässrige Phase verwerfen, Ethylacetatphase in Schütteltrichter zur Trocknung überführen und 4 g Natriumsulfat hinzufügen
- Ethylacetat langsam durch das Natriumsulfat aus dem Trichter auslassen und unter Stickstoff vollständig niedertrocknen

**Probenbegleitschein des Güllemonitorings**Regierungsbezirk:Betriebsart\*\*:Zuchtbetrieb Mastbetrieb Gemischter Betrieb Betriebsgröße\*\*:Zuchtbetrieb 10-45 Zuchtsauen  über 45 Zuchtsauen Mastbetrieb 30-220 Masttiere  über 220 Masttiere Gemischter Betrieb 7-30 Zuchtsauen  über 30 Zuchtsauen Gülle vor Probennahme aufgerührt\*\*:Ja  Nein Sonstige Anmerkungen: (z.B. Biogasgülle)

\*\* Zutreffendes bitte ankreuzen

## Ergebnisse der Antibiotika-Analyse [mg/kg]

Nr.	Betriebs- typ	Betriebs- größe	TS	CTC	TC	OTC	DOXY	SMT	N4- SMT	SD	SM	SMX	ST	SDM
1	Gemischt	groß	2,6	< BG	< BG	< BG	< BG	0,08	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
2	Mast	groß	7,9	< BG	< BG	< BG	< BG	0,08	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
3	Mast	klein	3,6	< BG	< BG	< BG	< BG	0,13	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
4	Zucht	klein	0,7	< BG	< BG	< BG	< BG	0,09	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
5	Gemischt	klein	2,9	< BG	< BG	< BG	< BG	0,15	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
6	Mast	groß	7,0	0,11	0,62	< BG	< BG	0,31	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
7	Gemischt	groß	4,2	< BG	< BG	< BG	< BG	0,12	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
8	Zucht	klein	0,8	< BG	0,32	< BG	< BG	0,26	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
9	Mast	groß	3,5	0,11	< BG	< BG	< BG	0,15	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
10	Gemischt	groß	8,2	< BG	< BG	< BG	< BG	0,09	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
11	Zucht	klein	2,8	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
12	Zucht	klein	1,3	< BG	< BG	0,20	< BG	0,08	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
13	Mast	klein	5,6	< BG	< BG	< BG	< BG	0,19	0,10	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
14	Mast	groß	4,3	< BG	1,72	< BG	< BG	0,24	0,16	< BG	0,72	< BG	< BG	< BG
15	Mast	groß	8,0	< BG	0,16	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
16	Zucht	groß	3,4	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
17	Gemischt	klein	2,5	< BG	< BG	< BG	< BG	0,06	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
18	Mast	groß	6,6	0,12	0,18	< BG	< BG	0,06	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
19	Gemischt	klein	3,1	< BG	< BG	< BG	< BG	0,06	0,07	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
20	Gemischt	klein	4,3	0,14	< BG	< BG	0,21	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
21	Mast	groß	3,3	2,04	1,79	< BG	0,52	0,08	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
22	Gemischt	groß	5,0	0,13	< BG	< BG	< BG	0,05	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
23	Zucht	klein	2,3	3,27	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
24	Gemischt	groß	3,2	< BG	< BG	< BG	< BG	0,15	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
25	Gemischt	klein	1,1	< BG	< BG	< BG	< BG	0,20	< BG	< BG	0,86	< BG	< BG	< BG
26	Gemischt	groß	5,7	0,11	< BG	< BG	< BG	0,16	0,07	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
27	Gemischt	klein	0,9	0,22	< BG	< BG	< BG	0,51	0,99	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
28	Zucht	klein	0,6	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
29	Zucht	groß	0,9	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
30	Gemischt	klein	4,7	< BG	< BG	< BG	< BG	0,09	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
31	Gemischt	groß	5,5	< BG	< BG	< BG	< BG	0,13	0,09	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
32	Zucht	groß	1,6	< BG	< BG	< BG	< BG	0,10	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
33	Mast	groß	1,8	1,36	< BG	< BG	< BG	0,32	0,05	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
34	Mast	groß	4,9	< BG	46,02	0,10	< BG	38,38	27,31	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
35	Mast	groß	0,7	0,98	0,14	< BG	< BG	0,09	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
36	Zucht	groß	0,9	< BG	< BG	< BG	< BG	0,12	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
37	Zucht	groß	8,0	0,18	< BG	0,16	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
38	Zucht	klein	3,3	< BG	< BG	< BG	< BG	0,06	0,11	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
39	Gemischt	klein	3,2	0,16	< BG	< BG	< BG	< BG	0,06	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
40	Gemischt	klein	4,5	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
41	Mast	groß	1,3	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
42	Gemischt	groß	2,3	< BG	0,29	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
43	Zucht	groß	6,7	< BG	14,22	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
44	Gemischt	groß	7,1	0,19	0,16	< BG	< BG	0,08	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
45	Gemischt	klein	1,4	0,15	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
46	Zucht	groß	1,7	< BG	1,86	< BG	< BG	0,18	< BG	0,20	< BG	< BG	< BG	< BG
47	Zucht	klein	1,2	< BG	< BG	< BG	< BG	0,06	0,07	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
48	Zucht	klein	2,8	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	0,09	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG





Nr.	Betriebs- typ	Betriebs- größe	TS	CTC	TC	OTC	DOXY	SMT	N4- SMT	SD	SM	SMX	ST	SDM
99	Gemischt	groß	<b>5,2</b>	< BG	<b>3,83</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
100	Mast	groß	<b>2,2</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,05</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
101	Gemischt	groß	<b>1,3</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
102	Gemischt	groß	<b>7,4</b>	<b>2,75</b>	<b>0,19</b>	< BG	< BG	<b>0,14</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
103	Mast	klein	<b>2,4</b>	<b>0,31</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,45</b>	<b>0,26</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
104	Gemischt	klein	<b>0,5</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
105	Gemischt	groß	<b>5,2</b>	<b>0,82</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,15</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
106	Gemischt	groß	<b>3,3</b>	<b>0,18</b>	<b>0,42</b>	< BG	< BG	<b>0,08</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
107	Gemischt	klein	<b>0,5</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
108	Mast	groß	<b>10,7</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
109	Zucht	groß	<b>0,3</b>	<b>4,49</b>	<b>0,23</b>	< BG	<b>0,66</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
110	Zucht	groß	<b>3,4</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
111	Gemischt	groß	<b>3,3</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
112	Zucht	groß	<b>4,9</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
113	Zucht	klein	<b>3,9</b>	<b>0,13</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
114	Mast	groß	<b>2,6</b>	< BG	<b>0,41</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
115	Mast	groß	<b>1,8</b>	<b>0,18</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
116	Zucht	groß	<b>0,5</b>	< BG	<b>7,16</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
117	Zucht	groß	<b>0,8</b>	<b>0,16</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
118	Gemischt	klein	<b>1,9</b>	<b>6,06</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
119	Gemischt	groß	<b>4,1</b>	<b>1,55</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
120	Gemischt	groß	<b>1,4</b>	<b>0,43</b>	<b>4,60</b>	<b>0,11</b>	< BG	<b>1,47</b>	<b>1,96</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
121	Zucht	groß	<b>4,3</b>	<b>0,44</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
122	Zucht	klein	<b>1,8</b>	< BG	<b>5,57</b>	< BG	< BG	<b>0,05</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
123	Gemischt	klein	<b>0,7</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
124	Zucht	klein	<b>1,7</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,08</b>	<b>0,05</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
125	Gemischt	klein	<b>4,4</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
126	Zucht	groß	<b>0,5</b>	<b>1,65</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
127	Gemischt	groß	<b>7,2</b>	<b>0,31</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,21</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
128	Gemischt	groß	<b>1,6</b>	<b>0,19</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,58</b>	< BG	<b>0,89</b>	< BG	< BG	< BG	< BG
129	Mast	klein	<b>4,6</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
130	Zucht	groß	<b>3,5</b>	<b>0,69</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,22</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,93</b>	< BG
131	Mast	klein	<b>3,1</b>	<b>0,20</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,11</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
132	Zucht	groß	<b>9,2</b>	<b>4,53</b>	<b>0,18</b>	< BG	< BG	<b>0,53</b>	<b>0,46</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
133	Gemischt	klein	<b>5,2</b>	<b>0,11</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,10</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
134	Gemischt	klein	<b>8,1</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,05</b>	<b>0,15</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
135	Zucht	klein	<b>0,5</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
136	Mast	klein	<b>2,0</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,06</b>	<b>0,14</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
137	Mast	klein	<b>3,4</b>	<b>0,99</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,09</b>	<b>0,10</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
138	Zucht	klein	<b>1,5</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,18</b>	<b>0,16</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
139	Gemischt	klein	<b>5,1</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
140	Mast	groß	<b>7,2</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,08</b>	<b>0,07</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
141	Mast	klein	<b>5,5</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,08</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
142	Gemischt	klein	<b>9,7</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,10</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
143	Mast	klein	<b>8,0</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,07</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
144	Gemischt	groß	<b>12,8</b>	< BG	<b>0,34</b>	< BG	< BG	<b>0,09</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
145	Gemischt	klein	<b>3,8</b>	< BG	<b>0,42</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
146	Zucht	groß	<b>0,7</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
147	Gemischt	klein	<b>2,1</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,38</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
148	Mast	klein	<b>7,3</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,41</b>	<b>0,49</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG



Nr.	Betriebs- typ	Betriebs- größe	TS	CTC	TC	OTC	DOXY	SMT	N4- SMT	SD	SM	SMX	ST	SDM
199	Gemischt	groß	2,4	< BG	< BG	< BG	< BG	0,06	0,07	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
200	Gemischt	groß	3,2	< BG	< BG	< BG	< BG	0,05	0,11	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
201	Zucht	groß	1,2	0,40	0,47	< BG	< BG	0,18	0,09	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
202	Zucht	groß	3,2	< BG	< BG	< BG	< BG	0,21	0,10	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
203	Zucht	klein	5,9	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
204	Zucht	groß	1,5	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
205	Mast	groß	4,9	0,17	1,46	< BG	< BG	0,06	0,07	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
206	Gemischt	klein	7,0	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	0,07	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
207	Zucht	groß	2,9	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
208	Gemischt	groß	3,4	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
209	Zucht	groß	2,5	< BG	< BG	< BG	< BG	0,10	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
210	Mast	groß	4,1	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	0,07	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
211	Gemischt	groß	4,5	1,20	< BG	< BG	< BG	0,15	0,11	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
212	Zucht	klein	0,4	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
213	Mast	klein	9,4	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
214	Gemischt	groß	5,2	3,13	< BG	< BG	< BG	< BG	0,10	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
215	Gemischt	groß	5,0	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
216	Gemischt	groß	1,6	0,11	< BG	< BG	< BG	0,71	0,65	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
217	Mast	groß	3,1	5,84	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
218	Gemischt	groß	8,1	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	0,07	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
219	Gemischt	klein	8,2	< BG	< BG	< BG	< BG	0,08	< BG	< BG	< BG	0,48	< BG	< BG
220	Gemischt	groß	2,2	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
221	Mast	groß	8,2	0,62	0,53	< BG	< BG	1,36	0,67	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
222	Gemischt	groß	4,3	0,11	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
223	Mast	groß	3,7	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
224	Gemischt	groß	3,2	< BG	0,16	0,87	< BG	0,08	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
225	Gemischt	klein	0,5	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
226	Zucht	groß	0,7	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
227	Gemischt	groß	0,7	0,33	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
228	Zucht	klein	0,5	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
229	Gemischt	klein	4,2	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
230	Gemischt	groß	8,0	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
231	Zucht	groß	1,8	18,12	0,60	< BG	< BG	0,44	0,28	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
232	Gemischt	groß	7,0	0,12	< BG	< BG	< BG	0,06	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
233	Mast	klein	4,9	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	0,10	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
234	Gemischt	groß	6,8	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	0,11	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
235	Gemischt	groß	9,0	< BG	< BG	< BG	< BG	0,05	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
236	Gemischt	groß	2,1	< BG	0,68	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
237	Gemischt	klein	1,1	0,65	< BG	< BG	< BG	0,51	0,23	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
238	Gemischt	klein	7,6	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
239	Zucht	klein	1,1	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
240	Mast	klein	1,2	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
241	Gemischt	klein	8,7	< BG	0,11	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
242	Gemischt	groß	0,9	0,15	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
243	Gemischt	groß	6,4	8,45	0,39	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
244	Gemischt	klein	1,7	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
245	Gemischt	groß	2,5	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
246	Zucht	klein	1,2	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
247	Zucht	groß	3,1	< BG	< BG	< BG	< BG	0,07	0,05	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
248	Mast	klein	7,6	0,27	< BG	< BG	< BG	< BG	0,07	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG

Nr.	Betriebs- typ	Betriebs- größe	TS	CTC	TC	OTC	DOXY	SMT	N4- SMT	SD	SM	SMX	ST	SDM
249	Mast	groß	<b>1,6</b>	< BG	<b>0,12</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
250	Zucht	groß	<b>0,5</b>	< BG	<b>3,87</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
251	Gemischt	klein	<b>17,3</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,05</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
252	Gemischt	groß	<b>1,4</b>	<b>0,12</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,27</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
253	Mast	klein	<b>1,1</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
254	Gemischt	groß	<b>2,5</b>	< BG	<b>2,69</b>	< BG	< BG	<b>0,05</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
255	Gemischt	groß	<b>2,6</b>	<b>0,15</b>	<b>1,00</b>	< BG	< BG	<b>0,08</b>	<b>0,05</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
256	Zucht	groß	<b>1,6</b>	< BG	<b>1,97</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
257	Gemischt	groß	<b>1,7</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
258	Zucht	klein	<b>0,5</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
259	Gemischt	groß	<b>2,3</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,21</b>	<b>0,06</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
260	Mast	klein	<b>3,3</b>	<b>0,39</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,29</b>	<b>0,06</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
261	Gemischt	groß	<b>3,1</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,06</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
262	Mast	klein	<b>2,2</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,06</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
263	Mast	groß	<b>4,2</b>	<b>3,70</b>	<b>0,30</b>	< BG	< BG	<b>0,10</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
264	Zucht	groß	<b>0,9</b>	<b>0,28</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
265	Mast	groß	<b>4,4</b>	<b>0,98</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,42</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
266	Mast	groß	<b>0,8</b>	<b>0,33</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
267	Zucht	klein	<b>3,3</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,05</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
268	Gemischt	klein	<b>15,7</b>	<b>0,11</b>	<b>0,28</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
269	Gemischt	klein	<b>10,6</b>	<b>0,14</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,05</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
270	Zucht	groß	<b>1,7</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,06</b>	<b>0,07</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
271	Zucht	klein	<b>7,6</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
272	Zucht	klein	<b>1,4</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,24</b>	<b>0,06</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
273	Mast	klein	<b>1,0</b>	<b>1,18</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
274	Zucht	klein	<b>2,9</b>	<b>0,11</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
275	Mast	groß	<b>7,2</b>	<b>0,33</b>	<b>0,34</b>	< BG	< BG	<b>1,02</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,33</b>
276	Gemischt	groß	<b>1,7</b>	<b>0,12</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,11</b>	<b>0,09</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
277	Mast	groß	<b>4,6</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
278	Mast	groß	<b>5,5</b>	<b>0,18</b>	<b>3,67</b>	< BG	< BG	<b>2,20</b>	< BG	<b>1,64</b>	< BG	< BG	< BG	< BG
279	Gemischt	groß	<b>3,6</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,07</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
280	Mast	groß	<b>4,5</b>	<b>0,18</b>	<b>3,96</b>	< BG	< BG	<b>0,07</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
281	Mast	groß	<b>4,1</b>	<b>6,21</b>	<b>1,54</b>	< BG	< BG	<b>3,84</b>	<b>0,30</b>	<b>0,31</b>	< BG	< BG	< BG	< BG
282	Mast	groß	<b>2,6</b>	<b>0,73</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,60</b>	<b>0,21</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
283	Zucht	groß	<b>4,5</b>	<b>0,65</b>	<b>3,98</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,06</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
284	Mast	klein	<b>1,4</b>	<b>0,92</b>	< BG	< BG	< BG	<b>2,51</b>	<b>0,61</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
285	Zucht	klein	<b>5,2</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,10</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
286	Mast	groß	<b>2,9</b>	<b>0,35</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,10</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
287	Mast	groß	<b>3,6</b>	<b>12,55</b>	<b>0,76</b>	< BG	< BG	<b>1,00</b>	< BG	<b>0,14</b>	< BG	<b>0,59</b>	< BG	< BG
288	Mast	groß	<b>3,1</b>	<b>1,26</b>	<b>3,19</b>	< BG	< BG	<b>0,13</b>	< BG	<b>4,05</b>	< BG	< BG	< BG	< BG
289	Zucht	groß	<b>1,0</b>	< BG	<b>1,06</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
290	Mast	groß	<b>5,1</b>	<b>0,72</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,15</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
291	Gemischt	groß	<b>3,3</b>	<b>1,45</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
292	Zucht	groß	<b>2,5</b>	<b>18,33</b>	<b>0,91</b>	<b>0,11</b>	< BG	<b>0,69</b>	<b>0,18</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
293	Zucht	groß	<b>1,5</b>	<b>7,19</b>	<b>0,17</b>	< BG	< BG	<b>0,14</b>	<b>0,14</b>	<b>0,12</b>	< BG	< BG	< BG	< BG
294	Zucht	groß	<b>1,9</b>	<b>1,62</b>	< BG	< BG	< BG	<b>3,45</b>	<b>0,85</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
295	Mast	groß	<b>2,9</b>	<b>1,30</b>	<b>1,83</b>	< BG	< BG	<b>0,49</b>	<b>0,27</b>	<b>0,78</b>	< BG	< BG	< BG	< BG
296	Mast	groß	<b>2,8</b>	<b>0,63</b>	<b>4,42</b>	<b>0,15</b>	< BG	<b>0,58</b>	<b>0,14</b>	<b>2,48</b>	<b>0,30</b>	< BG	< BG	< BG
297	Zucht	groß	<b>2,7</b>	<b>1,00</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,94</b>	<b>0,53</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
298	Zucht	klein	<b>1,4</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,53</b>	< BG	< BG

Nr.	Betriebs- typ	Betriebs- größe	TS	CTC	TC	OTC	DOXY	SMT	N4- SMT	SD	SM	SMX	ST	SDM
299	Zucht	klein	<b>6,6</b>	<b>8,59</b>	<b>28,04</b>	< BG	< BG	<b>0,24</b>	<b>0,14</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
300	Zucht	groß	<b>2,8</b>	<b>0,10</b>	<b>0,20</b>	< BG	< BG	<b>0,11</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
301	Zucht	groß	<b>2,8</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
302	Zucht	groß	<b>1,9</b>	<b>0,99</b>	<b>1,41</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
303	Mast	klein	<b>2,0</b>	< BG	< BG	<b>0,25</b>	< BG	<b>1,48</b>	<b>0,22</b>	<b>0,13</b>	<b>0,91</b>	< BG	< BG	< BG
304	Mast	groß	<b>3,9</b>	< BG	<b>1,70</b>	< BG	< BG	<b>2,56</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
305	Mast	groß	<b>9,7</b>	<b>0,11</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,06</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
306	Mast	groß	<b>3,9</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,10</b>	<b>0,16</b>	<b>0,48</b>	< BG	< BG	< BG	< BG
307	Mast	groß	<b>6,5</b>	< BG	<b>3,15</b>	< BG	< BG	<b>0,72</b>	<b>0,07</b>	<b>2,75</b>	< BG	< BG	< BG	< BG
308	Zucht	groß	<b>2,4</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,56</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,53</b>	< BG
309	Mast	groß	<b>4,7</b>	<b>0,13</b>	<b>10,96</b>	<b>0,11</b>	< BG	<b>10,63</b>	<b>0,08</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
310	Zucht	groß	<b>1,7</b>	< BG	<b>0,27</b>	< BG	< BG	<b>0,25</b>	<b>0,05</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
311	Gemischt	groß	<b>3,1</b>	< BG	< BG	<b>0,22</b>	< BG	<b>0,75</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
312	Gemischt	groß	<b>1,9</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,08</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
313	Zucht	groß	<b>4,8</b>	< BG	<b>0,67</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
314	Gemischt	groß	<b>11,3</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,05</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,74</b>	< BG
315	Mast	groß	<b>4,6</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
316	Zucht	groß	<b>1,5</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
317	Zucht	groß	<b>2,8</b>	<b>0,40</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,41</b>	<b>0,09</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
318	Mast	groß	<b>4,0</b>	<b>0,11</b>	<b>4,34</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
319	Mast	groß	<b>7,2</b>	< BG	<b>0,24</b>	< BG	< BG	<b>0,08</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
320	Gemischt	groß	<b>2,2</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
321	Zucht	groß	<b>0,5</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
322	Mast	groß	<b>2,7</b>	<b>7,70</b>	<b>0,22</b>	< BG	< BG	<b>0,97</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
323	Gemischt	groß	<b>1,2</b>	<b>0,29</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
324	Mast	groß	<b>2,0</b>	<b>1,84</b>	<b>0,63</b>	< BG	< BG	<b>0,06</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,65</b>
325	Mast	groß	<b>2,6</b>	<b>7,18</b>	<b>0,34</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
326	Mast	groß	<b>3,0</b>	< BG	<b>5,32</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
327	Mast	groß	<b>2,7</b>	<b>2,41</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,13</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
328	Mast	groß	<b>4,6</b>	< BG	<b>1,76</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
329	Gemischt	groß	<b>1,8</b>	<b>0,33</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,12</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
330	Mast	groß	<b>2,1</b>	<b>6,12</b>	<b>0,14</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
331	Mast	groß	<b>7,7</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
332	Zucht	groß	<b>1,0</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
333	Mast	klein	<b>6,0</b>	<b>0,16</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,14</b>	<b>0,08</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
334	Zucht	groß	<b>1,4</b>	< BG	<b>0,65</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
335	Zucht	groß	<b>6,4</b>	<b>50,84</b>	<b>1,80</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
336	Mast	klein	<b>4,5</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
337	Gemischt	groß	<b>4,6</b>	< BG	<b>0,13</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,10</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
338	Gemischt	groß	<b>4,4</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
339	Zucht	groß	<b>7,2</b>	< BG	<b>3,33</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
340	Gemischt	groß	<b>2,5</b>	< BG	<b>1,23</b>	< BG	< BG	<b>0,17</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
341	Zucht	groß	<b>1,1</b>	< BG	<b>0,22</b>	< BG	< BG	<b>0,07</b>	< BG	<b>0,13</b>	< BG	< BG	< BG	< BG
342	Zucht	groß	<b>1,6</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
343	Gemischt	klein	<b>3,8</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
344	Gemischt	klein	<b>9,9</b>	< BG	<b>0,51</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,06</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
345	Mast	klein	<b>7,5</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,07</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
346	Gemischt	klein	<b>2,9</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
347	Gemischt	klein	<b>6,0</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
348	Mast	klein	<b>12,0</b>	<b>0,11</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,11</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG

Nr.	Betriebs- typ	Betriebs- größe	TS	CTC	TC	OTC	DOXY	SMT	N4- SMT	SD	SM	SMX	ST	SDM
349	Zucht	klein	<b>1,0</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
350	Gemischt	klein	<b>1,7</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
351	Gemischt	groß	<b>2,6</b>	<b>0,21</b>	< BG	<b>0,13</b>	< BG	<b>0,06</b>	<b>0,05</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
352	Mast	groß	<b>6,4</b>	<b>0,23</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,08</b>	<b>0,09</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
353	Gemischt	groß	<b>3,6</b>	<b>3,67</b>	<b>0,13</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
354	Mast	klein	<b>12,1</b>	< BG	< BG	<b>0,12</b>	< BG	<b>0,27</b>	<b>0,11</b>	< BG	<b>0,15</b>	< BG	< BG	< BG
355	Zucht	groß	<b>7,4</b>	<b>1,34</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,05</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
356	Mast	klein	<b>7,9</b>	<b>0,11</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,10</b>	<b>0,10</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
357	Mast	klein	<b>1,0</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
358	Zucht	groß	<b>2,6</b>	<b>1,30</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
359	Gemischt	groß	<b>8,2</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,12</b>	<b>0,17</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
360	Mast	groß	<b>2,2</b>	<b>0,71</b>	<b>8,80</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
361	Mast	groß	<b>4,9</b>	<b>1,66</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,10</b>	<b>0,11</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
362	Gemischt	klein	<b>3,1</b>	<b>0,14</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
363	Gemischt	groß	<b>3,9</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
364	Mast	klein	<b>7,4</b>	<b>8,20</b>	<b>0,22</b>	< BG	< BG	<b>0,05</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
365	Gemischt	groß	<b>4,2</b>	<b>0,20</b>	<b>10,08</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
366	Mast	klein	<b>4,7</b>	<b>0,23</b>	<b>1,48</b>	< BG	< BG	<b>0,08</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
367	Mast	groß	<b>4,3</b>	<b>0,16</b>	<b>4,94</b>	< BG	< BG	<b>0,11</b>	<b>0,07</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
368	Mast	klein	<b>3,3</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,13</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
369	Gemischt	klein	<b>6,4</b>	<b>0,17</b>	<b>2,81</b>	< BG	< BG	<b>0,09</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
370	Zucht	groß	<b>3,9</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,10</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
371	Gemischt	groß	<b>5,9</b>	< BG	<b>13,25</b>	<b>0,18</b>	< BG	<b>2,58</b>	<b>0,17</b>	<b>1,69</b>	<b>0,93</b>	< BG	< BG	< BG
372	Gemischt	groß	<b>1,0</b>	<b>1,01</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,40</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,55</b>	< BG
373	Gemischt	groß	<b>2,9</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,06</b>	<b>0,05</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
374	Mast	groß	<b>2,7</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
375	Mast	groß	<b>3,2</b>	<b>0,51</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,21</b>	<b>0,11</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
376	Mast	groß	<b>2,9</b>	<b>4,19</b>	< BG	< BG	< BG	<b>0,07</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
377	Mast	groß	<b>1,7</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
378	Mast	groß	<b>1,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,21</b>	< BG	< BG	<b>0,72</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
379	Mast	groß	<b>2,3</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,09</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
380	Zucht	groß	<b>2,7</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	<b>0,82</b>	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG

BG = Bestimmbarkeitsgrenze: Tetrazykline: 0,1 mg/mg  
Sulfonamide: 0,05 mg/kg

---

## Lebenslauf

Name: Katrin Harms geb. Mohr  
geboren: 02.01.1977 in München  
Eltern: Dr. Gerhard Mohr  
Margarete Mohr, geb. Messelhäußer  
wohnhaft in: 85356 Freising  
Staatangehörigkeit: Deutsch

### Schulbildung:

1984 - 1988: Grundschule Eichenried  
1988 - 1996: Gymnasium Erding  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Studium:

09/1996 – 05/2002: Studium der Agrarwissenschaften, TUM-Weihenstephan  
Studienrichtung: Landbewirtschaftung und Umwelt  
Abschluss: Dipl.-Ing. agr. (Univ.)

### Berufliche Tätigkeiten:

seit 05/2002: wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Tierhygiene, Freising

## Danksagung

Diese Arbeit wurde vom Bayerischen Ministerium für Landwirtschaft und Forsten gefördert.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Bauer möchte ich mich für die freundliche Überlassung des sehr interessanten Themas ganz herzlich bedanken.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Dr. Meyer für die Übernahme des Koreferates, sowie Herrn Prof. Dr. Dr. Parlar für den Prüfungsvorsitz.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Karsten Meyer für seine zahlreichen Anregungen und Ideen, die sehr gute Zusammenarbeit und die Betreuung beim Verfassen dieser Arbeit.

Bei meinen Kolleginnen und Kollegen an der Tierhygiene möchte ich mich für die herzliche Aufnahme in ihrer Mitte bedanken. Ein ganz besonderes Dankeschön geht an das „Analytik-Team“ (Herrn René Mamet, Frau Andrea Schott und Frau Michaela Bauer).

Für die konstruktive Zusammenarbeit bei dem Gesamtprojekt und den guten Kontakt möchte ich ganz herzlich Frau Müller, sowie dem Institutsleiter Herrn Rippel, vom Institut für Agrarökologie, Ökologischen Landbau und Bodenschutz der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft danken.

Den Mitarbeitern des Instituts für Tierernährung der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) in Grub danke ich für die Herstellung des Untersuchungsmaterials zur Methodenentwicklung. Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dempfle (Fachgebiet für Biometrische Methoden des Lehrstuhls für Tierzucht der TUM Weihenstephan) für die statistische Auswahl der Proben des Güllemonitorings.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern, die mir meine Schulausbildung und das Studium ermöglicht haben und bei meiner Schwester, dass sie mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ganz herzlich danke ich schließlich meinem Mann Jann, der meine Arbeit mit großem Interesse verfolgte und mir stets mit viel Liebe zur Seite stand.