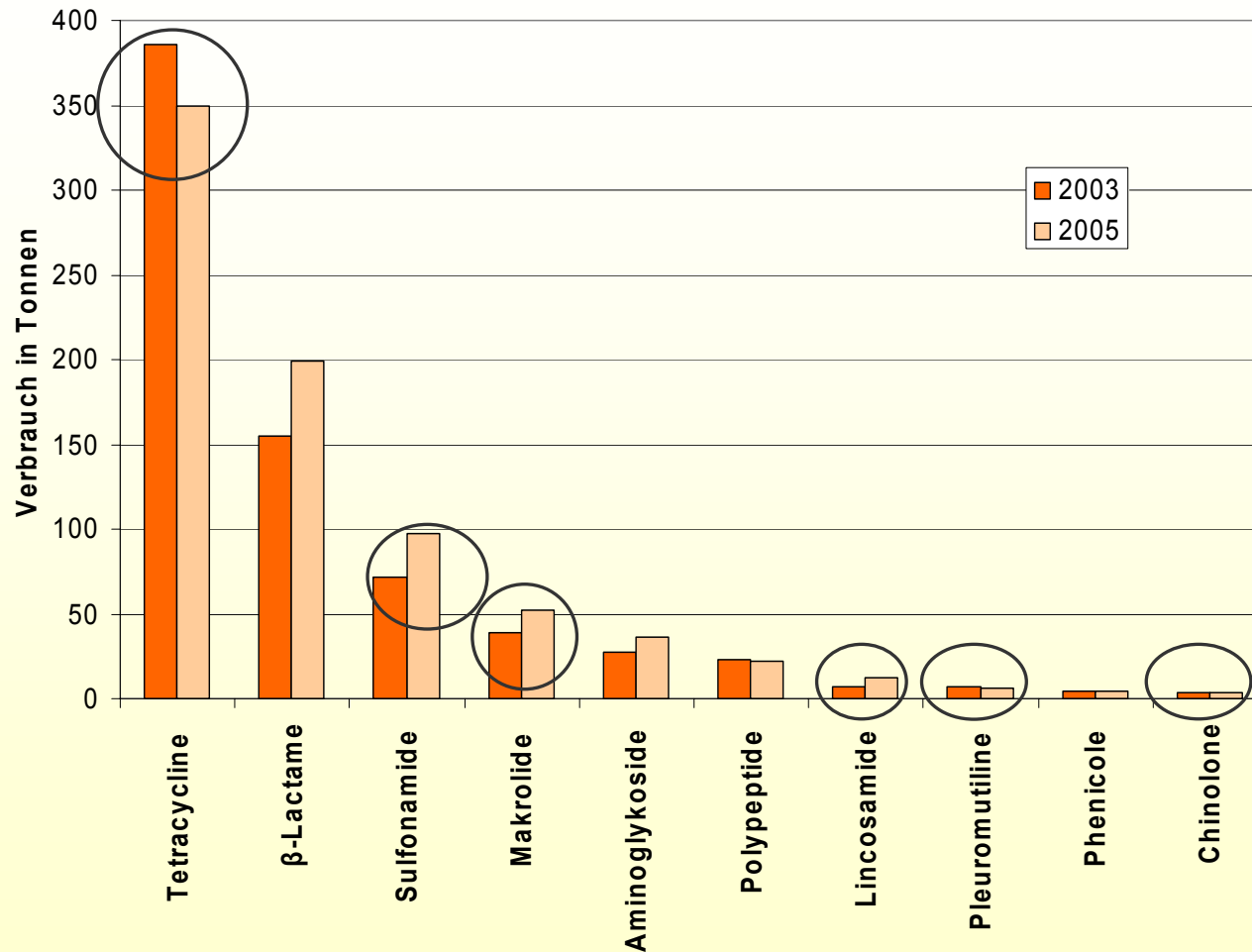


Antibiotikaeinträge über die Gülle

Erste Untersuchungen in Sachsen



Antibiotikaverbrauch laut GERMAP-2008 Studie



Einsatz von Veterinärantibiotika in Deutschland (Quelle: Veterinärpanel der Gesellschaft für Konsumforschung, GfK)

Methode für Sulfonamidbestimmung in Gülle

Einwaage 5g homogenisierte Gülle

Zugabe Mix ^{13}C -markierter Verbindungen zur WF-Kontrolle

Zugabe von Wasser 5 ml

Zugabe von Acetonitril 10 ml Schütteln

Zugabe von Salz –Mix 6,5 g schütteln, zentrifugieren

(4 g MgSO_4 + 1 g NaCl + 1 g Na_3 Citrat + 0,5 g Na_2 Citrat)

Überstand ausschütteln mit 0,5 g MgSO_4 + 150 mg Bakerbond C18 + 150 mg ENVI-Carb

Zentrifugieren und Überstand abfüllen

Messen mit LC/MS/MS

Quantifizieren über MRM Matrixkalibrierung

16 Verbindungen der Klassen Sulfonamide und Macrolide (keine Tetracycline)

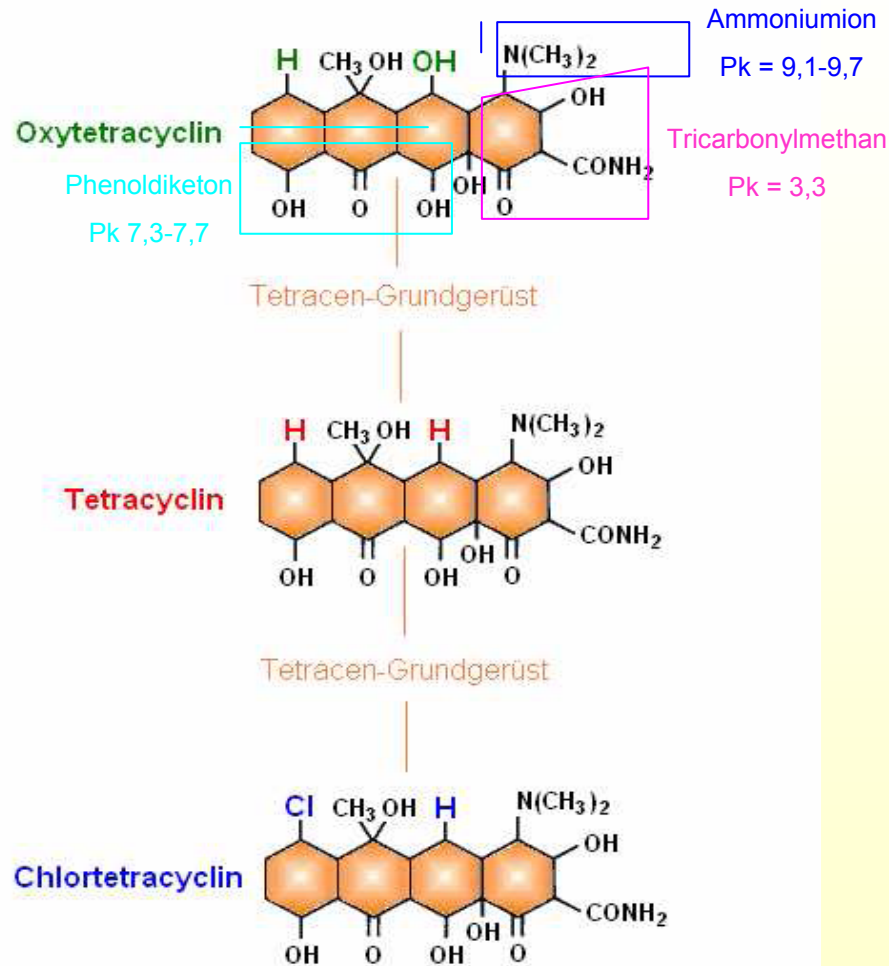
Methode für Sulfonamidbestimmung in Gülle

16 Verbindungen

| Standard | Abkürzung | Wirkstoffgruppe | BG | WF |
|------------------|-----------|-------------------|-------|-----|
| | | | µg/kg | % |
| Sulfamethazin | SFM | Sulfonamide | 10 | 91 |
| Sulfadiazin | SDZ | Sulfonamide | 10 | 100 |
| Sulfathiazol | SMTZ | Sulfonamide | 10 | 94 |
| Sulfamethoxazol | SMXZ | Sulfonamide | 10 | 97 |
| Sulfapyridin | SPD | Sulfonamide | 10 | 94 |
| Sulfaisoxazol | SIX | Sulfonamide | 10 | 94 |
| Sulfamerazin | SMR | Sulfonamide | 10 | 100 |
| Sulfaquinoxaline | SQX | Sulfonamide | 10 | 47 |
| Sulfadimethoxine | SDMO | Sulfonamide | 10 | 72 |
| Tiamulin | TIA | Pleuromutiline | 10 | 86 |
| Tylosin | TYL | Macrolide | 100 | 50 |
| Trimethoprim | TMP | Diaminopyrimidine | 10 | 42 |
| Enrofloxacin | ENFLO | Fluorchinolone | 100 | 4 |
| Clarithromycin | CLM | Macrolide | 10 | 61 |
| Erythromycin | ERM | Macrolide | 20 | 8 |
| Roxithromycin | ROM | Macrolide | 20 | 84 |

Tetracyclin-Chemie

Charakteristisches
viergliedriges
Ringsystem
Tetracen-Gerüst



Multimethode für Antibiotikabestimmung in Gülle

Einwaage 5g homogenisierte Gülle

Zugabe von Demecloxylin und Mix ^{13}C -markierter Verbdg. zur WF-Kontrolle

Zugabe McIlvain-Puffer (pH = 4) 1 x 25 ml

schütteln, zentrifugieren

Reinigen und aufkonzentrieren an Strata XL (reversed phase polymeric material)

Messen mit LC/MS/MS

Quantifizieren über MRM Matrixkalibrierung

Im Moment 22 Verbindungen der Klassen:

Tetracycline, Sulfonamide, Macrolide und Lincosamide

Methode für Tetracyclinbestimmung in Gülle

| Pr.-Nr | OTC | TC | CTC | e-OTC | e-TC | e-CTC | i-CTC | DC | e-DC | e-a-TC | e-a-CTC | e-Demecl o | Deme clo |
|-------------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | WF | WF | WF | WF | WF | WF | WF | WF | WF | WF | WF | WF | WF |
| | % | % | % | % | % | % | % | % | % | % | % | % | % |
| Guelle_WF ohne SPE_100 µg/kg | 102,7 | 112,2 | 62,8 | 100,8 | 112,3 | 95,2 | 76,5 | 97,7 | 160,3 | 50,7 | 134,3 | 97,7 | 186,7 |
| Guelle_WF ohne SPE_500 µg/kg | 100,3 | 104,9 | 63,3 | 93,5 | 82,5 | 79,1 | 83,0 | 92,1 | 88,9 | 20,0 | 27,3 | 73,6 | 117,1 |
| Guelle_WF ohne SPE_5000 µg/kg | 111,1 | 118,6 | 89,6 | 104,9 | 81,5 | 77,5 | 85,3 | 95,8 | 81,7 | 23,1 | 8,5 | 70,3 | 115,5 |
| mittlere WF | 104,7 | 111,9 | 71,9 | 99,7 | 92,1 | 83,9 | 81,6 | 95,2 | 110,3 | 31,2 | 56,7 | 80,5 | 139,7 |

BG 100 µg/kg

| | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|
| Guelle_WF mit SPE_100 µg/kg | 72,3 | 73 | 59,7 | 58,7 | 58,0 | 61,9 | 54,4 | 50,2 | 52,5 | 5,7 | 6,0 | 47,4 | 67,4 |
| Guelle_WF mit SPE_500 µg/kg | 79,9 | 83,2 | 67,1 | 67,5 | 63,3 | 89,5 | 57,9 | 61,2 | 59,3 | 5,8 | 1,6 | 53,8 | 74,2 |
| Guelle_WF mit SPE_5000 µg/kg | 74,4 | 75,7 | 61,3 | 60,9 | 65,1 | 77,1 | 50,3 | 58,5 | 53,4 | 7,6 | 2,4 | 54,3 | 66,5 |
| Mittlere WF | 75,6 | 77,4 | 62,7 | 62,4 | 62,1 | 76,2 | 54,2 | 56,6 | 55,1 | 6,4 | 3,3 | 51,8 | 69,3 |

BG 10 µg/kg

jede Konzentration 3 Werte gemittelt

Multimethode für Antibiotikabestimmung in Gülle

| | SFM | SDZ | SMTZ | SMXZ | SPD | SIX | SMR | SQX | SDMO |
|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | WF % | WF % | WF % | WF % | WF % | WF % | WF % | WF % | WF % |
| Gülle + 40 µg/kg | 52 | 61 | 53 | 57 | 58 | 56 | 56 | 26 | 45 |

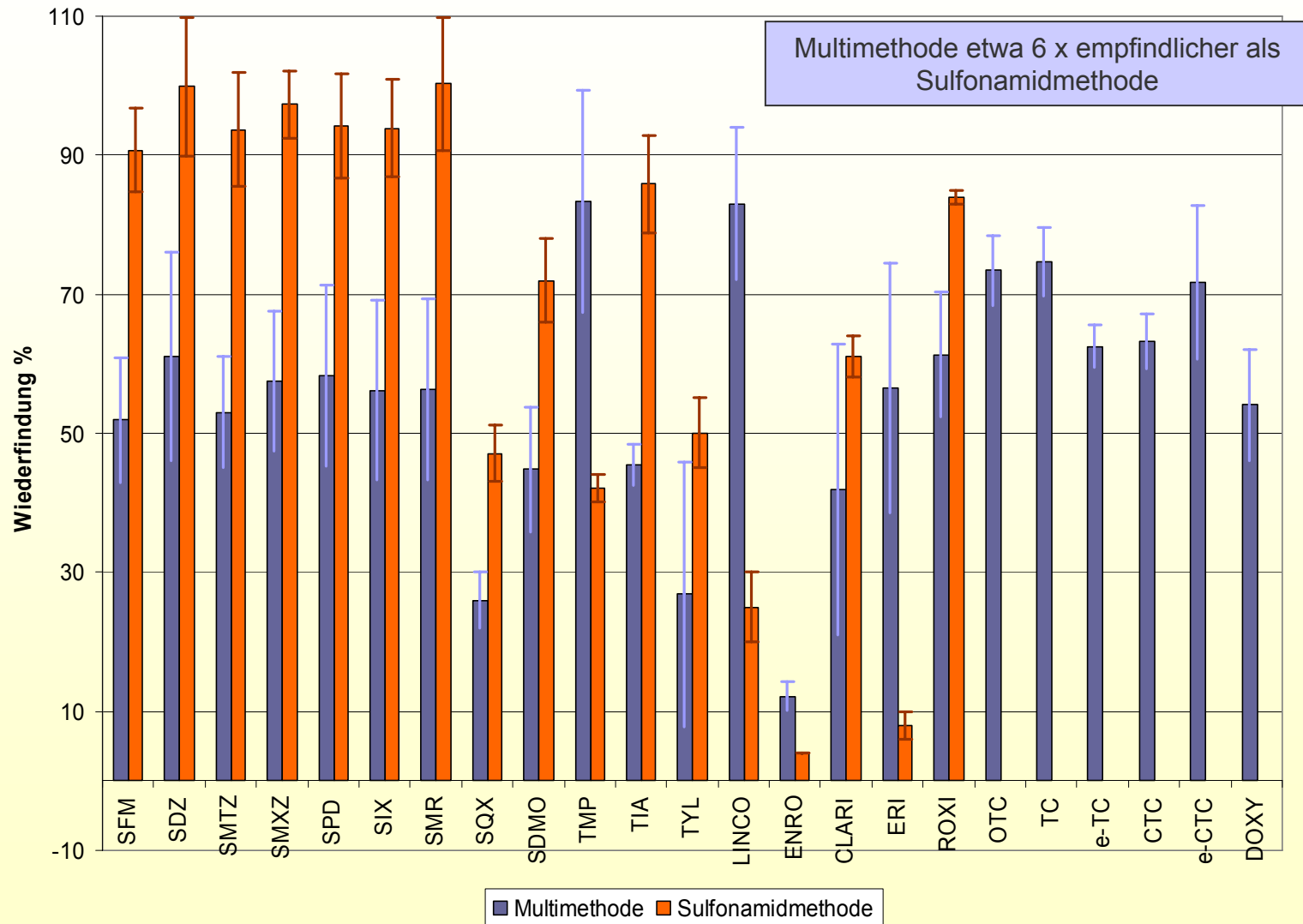
| | TMP | TIA | TYL | LINCO | ENRO | CLARI | ERI | ROXI |
|------------------|------|------|------|-------|------|-------|------|------|
| | WF % | WF % | WF % | WF % | WF % | WF % | WF % | WF % |
| Gülle + 40 µg/kg | 83 | 46 | 27 | 83 | 12 | 42 | 57 | 61 |

Ergebnisse aus jeweils 6 Bestimmungen gemittelt

Grün unterlegt: inakzeptable Wiederfindung

Gelb unterlegt: niedrige, aber reproduzierbare Wiederfindung

Methodenvergleich



Messbedingungen

■ HPLC: Shimadzu LC 10

Säule: Luna C18, 3 µm, 100 Å, 150 x 2 mm

Eluent A: Wasser/Acetonitril = 90/10 + 1 mM Ammoniumacetat + 0,05% Ameisensäure

Eluent B: Wasser/Acetonitril = 10/90 + 1 mM Ammoniumacetat + 0,05 % Ameisensäure

Gradient:

| Zeit | Eluent A | Eluent B |
|------|----------|----------|
| 0 | 100 | 0 |
| 16 | 0 | 100 |
| 20 | 0 | 100 |
| 24 | 0 | 100 |
| 25 | 100 | 0 |
| 33 | 100 | 0 |

Flow: 0,2 ml/min

Injektionsvolumen: 2 µl

■ MS: API 4000 ESI positiv, MRM-Mode, Quantifizierung über Tochterionen

Erste Ergebnisse aus Sachsen

I **2010: Untersuchung von 38 Gülleproben (Zufallsprinzip):**

22 Biogasgülle Rind

3 Biogasgülle Schwein

4 Rindergüllen

2 Schweinegülle

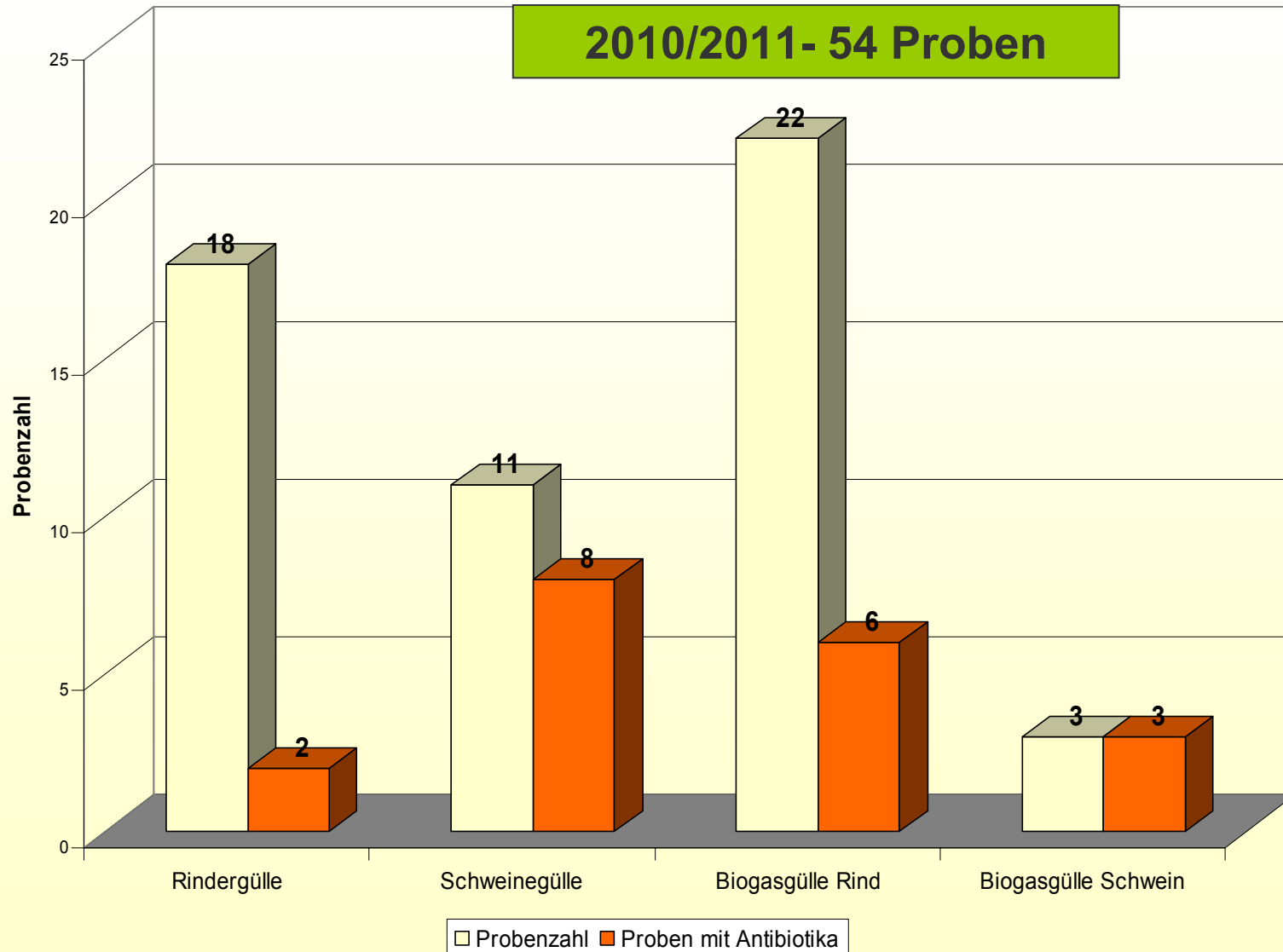
I **2011: 23 Gülleproben aus sächsischen Betrieben auf freiwilliger Basis**

14 Rinderzuchtbetriebe (140 bis 1400 Rinder)

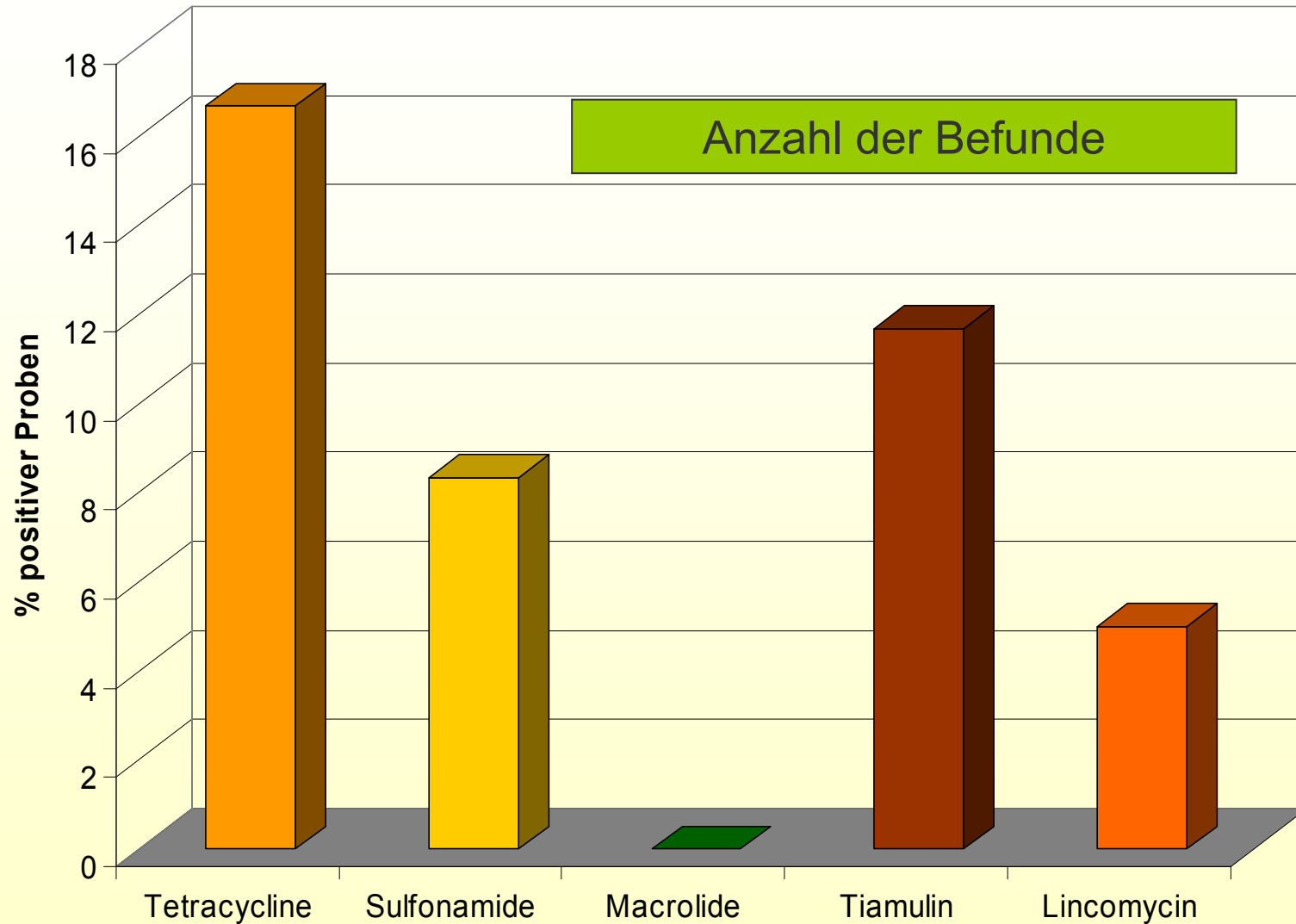
9 Schweinezuchtbetriebe (550 bis 5000 Mastschweine)

(Beteiligung am Projekt auf freiwilliger Basis)

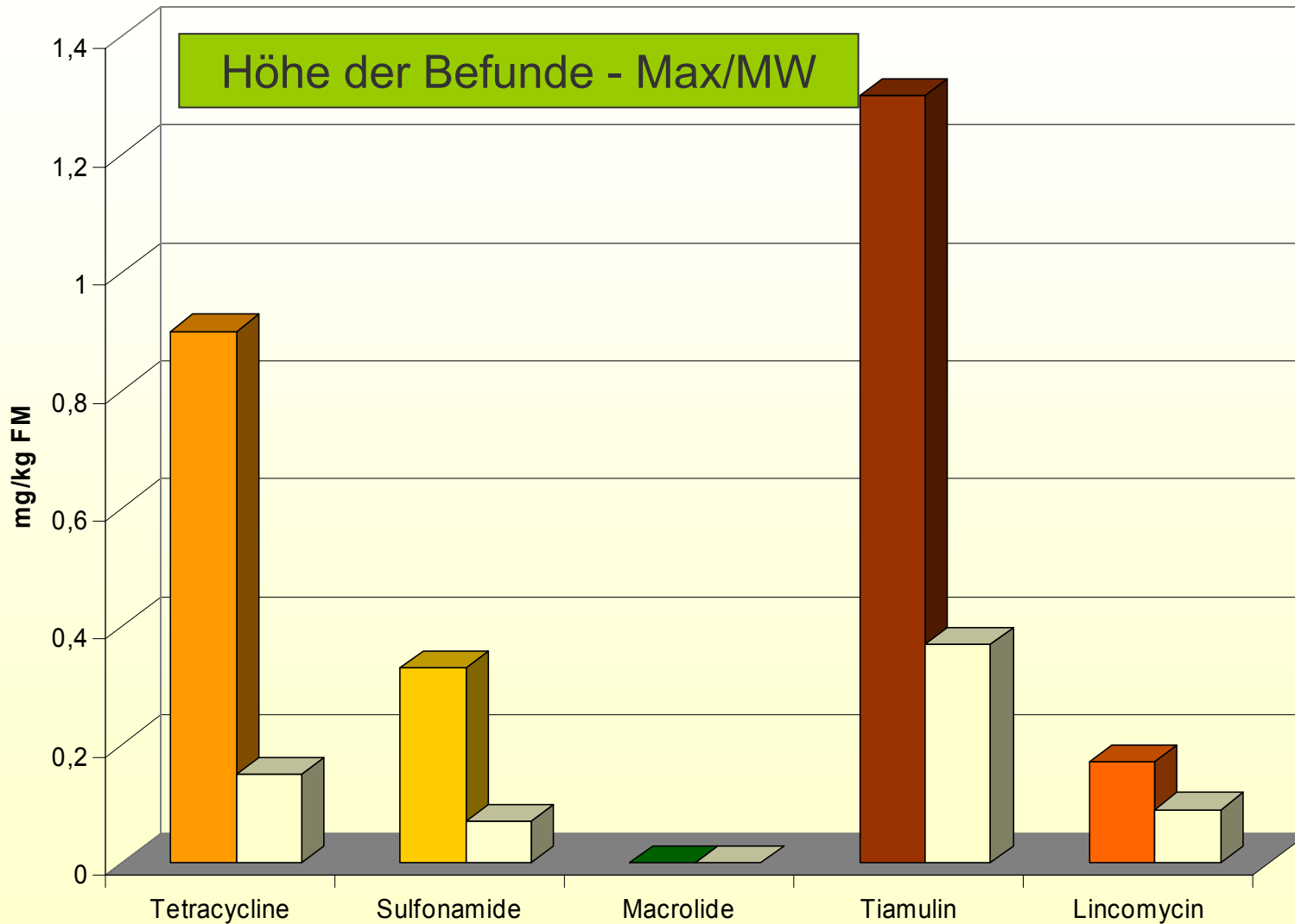
Antibiotika in sächsischen Gülleproben



Antibiotika in sächsischen Gülleproben



Antibiotika in sächsischen Gülleproben



Wirkung auf den Boden

- Antibiotika-Gehalt von 1mg/kg FS in der Gülle
- Gülleausbringung von 40 m³ / ha = 40 t Gülle / ha = 40 g Antibiotikum / ha
- Variante A: **Bodentiefe 30 cm (1,5 t / m³):**
 $100 \times 100 \times 0,3 = 3000 \text{ m}^3 \rightarrow 4500 \text{ t Boden}$
 $40 \text{ g Antibiotikum} / 4500 \text{ t} = 0,0088 \text{ mg/kg} = \text{ca. } 9 \text{ } \mu\text{g/kg}$
- Variante B: **Bodentiefe 5 cm (1,5 t / m³):**
 $100 \times 100 \times 0,005 = 500 \text{ m}^3 \rightarrow 750 \text{ t Boden}$
 $40 \text{ g Antibiotikum} / 750 \text{ t} = 0,053 \text{ mg/kg} = \text{53 } \mu\text{g / kg}$

Untersuchungen nach Gülleaufbringung

Boden und Pflanze

- In einem ersten Grobscreening wurden 12 Flächen beprobt, auf die zuvor Gülle appliziert wurde. Davon waren 6 Flächen im Bodendauerbeobachtungsprogramm (BDF)
- Lediglich auf einer Fläche des BDF-Programms in der Elbaue wurden Antibiotika im Boden nachgewiesen:
- **88 µg/kg Chlortetracycline und 110 µg/kg Tetracyclin**; dieses entspricht in der Größenordnung den Befunden eines repräsentativen Monitorings in Niedersachsen (30% der Proben > 100 µg/kg n. Pawelzick, 2005)
- Nach diesem Erstbefund wurde die Kernfläche der BDF erneut beprobt und ergänzend weitere Bodenproben mit Blick auf die Entfernung von der Elbe entnommen; Ergebnisse stehen noch aus.
- Ergänzend dazu entnommene Weizenproben zur Ernte zeigten keine Befunde

Ergebnisse und Diskussionspunkte

- 54 Gülleproben aus sächsischen Betrieben untersucht
- 35 % der Proben enthielten Antibiotika mit Gehalten bis zu 1,5 mg/kg in der Frischmasse
- Auf Grundlage dieser Voruntersuchungen wird ein Projekt initiiert (2012-2015):
 - Monitoring in 22 sächsischen Betrieben: 4 x pro Jahr Beprobung der Gülle, bei Befunden – Beprobung des Bodens und evtl. der Pflanze
 - Lysimeterversuch mit dotierter Gülle – Untersuchung des Antibiotikatransfers in Boden, Wasser und Pflanze
 - Erarbeitung eines Minimierungskonzeptes zur Reduzierung des Antibiotikaeinsatzes in Zusammenarbeit mit den Betrieben

Ergebnisse und Diskussionspunkte

- Einheitliche Methode – ja oder nein?
- Definition von Mindestanforderungen - Bestimmungsgrenzen – Wiederfindungen – Analysenfehler?
- Kalibrierung (interne Kalibrierung, Matrixkalibrierung, Standardaddition)
- Bestimmung in der Frischmasse oder Gefriertrocknung?
- Methodenvergleiche?