

Lennart Leif Lehmann
Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde

Antibiotika in
Wirtschaftsdüngern,
Klärschlämmen und
Gärresten und deren
Interaktion mit Pflanzen



Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut

Kontakt/Contact:
Lennart Leif Lehmann
Julius Kühn-Institut
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde
Bundesallee 50
38116 Braunschweig

Die Schriftenreihe „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ veröffentlicht Doktorarbeiten, die in enger Zusammenarbeit mit Universitäten an Instituten des Julius Kühn-Instituts entstanden sind.

The publication series „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ publishes doctoral dissertations originating from research doctorates and completed at the Julius Kühn-Institut (JKI) either in close collaboration with universities or as an outstanding independent work in the JKI research fields.

Der Vertrieb dieser Monographien erfolgt über den Buchhandel (Nachweis im Verzeichnis lieferbarer Bücher - VLB) und OPEN ACCESS im Internetangebot www.julius-kuehn.de Bereich Veröffentlichungen.

The monographs are distributed through the book trade (listed in German Books in Print - VLB) and OPEN ACCESS through the JKI website www.julius-kuehn.de (see Publications).

Wir unterstützen den offenen Zugang zu wissenschaftlichem Wissen.
Die Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut erscheinen daher OPEN ACCESS.
Alle Ausgaben stehen kostenfrei im Internet zur Verfügung:
<http://www.julius-kuehn.de> Bereich Veröffentlichungen.

We advocate open access to scientific knowledge. Dissertations from the Julius Kühn-Institut are therefore published open access. All issues are available free of charge under <http://www.julius-kuehn.de> (see Publications).

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation
In der Deutschen Nationalbibliografie: detaillierte bibliografische
Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek (German National Library)

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.dnb.de>.

ISBN 978-3-95547-047-0
DOI 10.5073/dissjki.2017.005

Herausgeber / Editor

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, Deutschland
Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany



Dieses Werk ist lizenziert unter einer [Creative Commons – Namensnennung – Weitergabe unter gleichen Bedingungen – 4.0 Lizenz](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

This work is licensed under a [Creative Commons – Attribution – ShareAlike – 4.0 license](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

Antibiotika in Wirtschaftsdüngern, Klärschlämmen und Gärresten und deren Interaktion mit Pflanzen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades

eines Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Lennart Leif Lehmann

aus Hildesheim

1. Referent: apl. Professor Dr. Dr. habil. Dr. h.c. Ewald Schnug

2. Referent: Professor Dr. Peter Winterhalter

eingereicht am: 20.02.2017

mündliche Prüfung (Disputation) am: 06.04.2017

Druckjahr 2017

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Lehmann, L., Bloem, E., Schick, J., Haneklaus, S.: The influence of anaerobic digestion on the concentration of antibiotics, heavy metals and P-solubility of digestates. (Poster, Beitrag im Tagungsband). Abstract Book, S. 47, RAMIRAN 2015 – 16th International Conference Rural-Urban Symbiosis, 8. – 10. September 2015, Hamburg, Deutschland

Lehmann, L., Bloem, E., Schick, J.: Suitability of methods for analyzing plant available P-fractions in digestates of biogas plants. (Poster, Beitrag im Tagungsband) P5.8, S. 249, 8th International Phosphorus Workshop IPW8, 12.–16. September 2016 Rostock, Deutschland

Danksagung

Ich danke herzlich Prof. Dr. Dr. Ewald Schnug, welcher mir als Mentor die Möglichkeit zur Promotion am Julius Kühn-Institut gegeben hat. Desweiteren danke ich den Mitgliedern der Promotionskommission, Prof. Dr. Peter Winterhalter und Prof. Dr. Robert Kreuzig.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Elke Bloem für die fruchtbaren Diskussionen und Ratschläge während der gesamten Arbeit, sowie für das stets offene Ohr und die Unterstützung. Bei dem gesamten Arbeitskreis möchte ich mich für das gute Arbeitsklima und die praktische Mitarbeit, insbesondere bei der Probenahme und Probenverarbeitung der meist nicht sehr angenehm riechenden Proben bedanken. An dieser Stelle möchte ich mich noch einmal bei allen Mitarbeitern des Julius Kühn-Instituts für die Geruchsbelästigung entschuldigen.

Dr. Judith Schick und Dr. Sylvia Kratz danke ich für die Hilfe bei Fragen rund um den Phosphor. Bei Dr. Kerstin Panten möchte ich mich bei der Hilfe bei der Literaturbeschaffung bedanken.

Zudem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des JKI, Studenten und Praktikanten welche an dieser Arbeit beteiligt waren.

Ich danke meinen Eltern, welche mir das Studium ermöglicht haben und mich auf meinem Weg immer unterstützt haben.

Diese Arbeit wurde vom BONUS PROMISE Projekt finanziert, gefördert von BONUS (Art 185), gemeinschaftlich finanziert von der EU, dem finnischen Ministerium für Land- und Forstwirtschaft, dem Forschungszentrum Jülich Beteiligungsgesellschaft mbH (Deutschland) und VINNOVA (Sweden).

This project was funded by BONUS PROMISE project that has received funding from BONUS (Art 185), funded jointly by the EU and Finnish Ministry of Agriculture and Forestry, Forschungszentrum Jülich Beteiligungsgesellschaft mbH (Germany) and VINNOVA (Sweden).

Inhalt

1 Einleitung.....	1
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Herkunft des Probenmaterials.....	13
2.2 Phosphorlöslichkeit der Eingangssubstrate und des Gärrests einer Biogasanlage.....	15
2.2.1 Experiment zur Bestimmung der Phosphorextrahierbarkeit in unterschiedlichen Substraten in Abhängigkeit von der Probenaufbereitung.....	15
2.2.2 Wasserlösliche Phosphorfractionen (H ₂ O) (VDLUFA, 1995b).....	19
2.2.3 Neutral-Ammonium-Citrat Extraktion (NAC) (VDLUFA, 1995a).....	20
2.2.4 Calcium-Ammonium-Lactat Extraktion (CAL) (Schüller, 1969).....	20
2.2.5 Gesamtphosphorgehalt (Königswasseraufschluss) (VDLUFA, 2000a).....	21
2.3 Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Antibiotikarückständen in Wirtschaftsdüngern, Klärschlämmen und Gärresten der Biovergasung.....	21
2.3.1 Extraktion der Antibiotika.....	21
2.3.2 LC-MS Methode zur Quantifizierung von Antibiotika in Probenextrakten.....	24
2.3.3 Zusammenfassung der optimierten Methode zur Bestimmung von Antibiotikarückständen in Gärresten und Substraten der Biovergasung.....	28
2.4 Kombinationstoxikologie von Antibiotika und Schwermetallen.....	30
2.4.1 Toxkits.....	30
2.4.2 Untersuchung der Toxizität von Enrofloxacin und Kupfer im Hydrokulturversuch.....	36
2.4.3 Anlage eines Gefäßversuchs zur Bestimmung der Toxizität von Enrofloxacin und Kupfer sowie deren Kombination auf die Biomasseentwicklung von <i>Sinapis alba</i>	38
2.4.4 Statistische Auswertung.....	43

3 Ergebnisse.....	45
3.1 Phosphorlöslichkeit aus Substraten sowie dem Gärrest einer Biogasanlage	45
3.1.1 Einfluss der Probenvorbereitung auf die löslichen Phosphor-Gehalte	45
3.1.2 Einfluss des Extraktionsmittels und der Messmethode (Kolorimetrie versus ICP) auf die ermittelte Fraktion an pflanzenverfügbarem Phosphor	50
3.1.3 P-Extrahierbarkeit von Substraten und Gärresten im Vergleich	52
3.2 Antibiotikagehalte in Wirtschaftsdüngern, Klärschlämmen und Biogasanlagen-Gärresten aus Deutschland, Schweden und Finnland	54
3.2.1 Antibiotikagehalte in Substraten der Biovergasung im Vergleich	55
3.2.2 Antibiotikagehalte im Endprodukt der Biovergasung	57
3.2.3 Substrate und Gärreste aus Deutschland, Schweden und Finnland im Vergleich.....	60
3.3 Toxikologie und Kombinationstoxikologie ausgewählter Antibiotika und Schwermetalle auf aquatische Organismen und Pflanzen	63
3.3.1 Ergebnisse der Toxkits zur Toxikologie von Antibiotika und Schwermetallen	64
3.3.2 Untersuchung der Toxizität von Enrofloxacin und Kupfer in einem Hydrokulturversuch.....	70
3.3.3 Gefäßversuch zur Toxikologie von Enrofloxacin und Kupfer sowie deren kombinatorischen Wirkung auf das Wachstum von <i>Sinapis alba</i>	73
4 Diskussion	80
4.1 Aussagekraft unterschiedlicher Phosphorextraktions- und Messmethoden hinsichtlich der Bewertung des pflanzenverfügbaren Phosphorgehaltes in Wirtschaftsdüngern und Gärresten	80
4.2 Bewertung der Kontamination von Wirtschaftsdüngern, Klärschlämmen und Gärresten hinsichtlich ihrer Antibiotikabelastung.....	89
4.2.1 Unterschiede in der Belastung von Substraten und Gärresten mit Antibiotika	90

4.2.2 Bedeutung der Antibiotikabelastung von Substraten und Gärresten hinsichtlich der Antibiotikafrachten, die aus der landwirtschaftlichen Verwertung resultieren.....	92
4.3 Toxikologie und kombinatorische Effekte von Antibiotikarückständen und Schwermetallen auf Flora und Fauna	96
4.3.1 Eignung von Toxkits für die Beurteilung der toxikologischen Wirkung von Antibiotika und Schwermetallen sowie möglicher kombinatorischer Effekte.....	97
4.3.2 Beurteilung des toxikologischen Potentials von Antibiotikawirkstoffen und Schwermetallen auf das Wachstum von <i>Sinapis alba</i> im Gefäßversuch am Beispiel der Enrofloxacin-Kupfer-Interaktion	104
4.3.3 Einschätzung des toxikologischen Potentials von Wirtschaftsdüngern, Klärschlämmen und Gärresten	107
5 Zusammenfassung	111
Anhang	115
Abbildungsverzeichnis.....	142
Tabellenverzeichnis.....	144
Abkürzungen	147

1 Einleitung

Phosphor (P) ist für alle lebenden Organismen ein essentieller Nährstoff, welcher unter anderem ein Baustein von DNA, Enzymen und dem für den Stoffwechsel wichtigen Adenosintriphosphat ist. Zugleich ist P eine endliche Ressource, welche hauptsächlich aus P-haltigem Gestein gewonnen wird, dessen abbauwürdige Vorkommen in 50 – 130 Jahren ausgebeutet sein werden (Déry et al., 2007). P kann nicht erneuert oder durch andere Stoffe ersetzt werden, weshalb das Schließen der Stoffkreisläufe dieser begrenzten Ressource vonnöten ist. Wirtschaftsdünger und Klärschlämme enthalten große Mengen Nährstoffe und können durch ihre Verwertung einen großen Teil zur Schonung der natürlichen P-Reserven beitragen.

Laut statistischem Bundesamt wurden im Jahr 2015 deutschlandweit Düngemittel abgegeben, welche 1,7 Mio. t Stickstoff, 287.700 t P_2O_5 und 398.000 t K_2O enthielten (Anonymous, 2016c). Dazu zählen schätzungsweise 65,5 Mio. Kubikmeter Gärreste jährlich, welche 390.000 t N (Stickstoff), 74.000 t P und 331.000 t Kalium (K) enthalten (Möller et al., 2012). Gärreste tragen somit signifikant zu der Gesamtmenge genutzter Nährstoffe bei. In den letzten 10 Jahren hat sich die Anzahl an Biogasanlagen in Deutschland von 3500 auf 9000 annähernd verdreifacht. Der Zubau von Anlagen hat sich jedoch in den letzten Jahren verlangsamt: Kamen von 2009 – 2011 jedes Jahr mehr als 1000 neue Biogasanlagen dazu, waren es ab 2012 nur wenige Hundert pro Jahr (Anonymous, 2015b). Zur Methanerzeugung werden in Biogasanlagen zu 95 % nachwachsende Rohstoffe (NawaRo) zusammen mit Wirtschaftsdüngern eingesetzt. Die restlichen Substrate machen kommunale Abfälle (3 %) und Reststoffe aus der Industrie (2 %) aus. Die am häufigsten verwendeten NawaRo sind Maissilage (73 %), Grassilage (12 %) und Getreide-Ganzpflanzensilage (7 %). Bei den Wirtschaftsdüngern kommt am häufigsten Rindergülle (69 %) zum Einsatz, gefolgt von Schweinegülle (14 %) und Geflügelmist (3 %) (Scheftelowitz et al., 2015). In der kommunalen Wasseraufbereitung fallen große Mengen von P an, welche als Klärschlämme und Klärschlammprodukte wie Aschen aus der Klärschlammverbrennung teilweise als Abfall entsorgt werden. Im Jahr 2013 fielen 3,3 Mio. t Klärschlamm-Trockenmasse in Deutschland an, von denen 550.000 t in der Landwirtschaft verwertet wurden, 1,6 Mio. t wurden thermisch

entsorgt. Durchschnittlich enthält Klärschlamm 2,9 % P, 4,4 % N und 0,4 % K₂O (Anonymous, 2016a).

Die Nutzung von Wirtschaftsdüngern in der Landwirtschaft wird durch das Düngegesetz (DüngG), die Düngeverordnung (DüV) und die Düngemittelverordnung (DüMV) geregelt. Wirtschaftsdünger sind tierische Exkrememente, welche in der Tierhaltung anfallen und zur Düngung von landwirtschaftlichen Flächen genutzt werden, während Klärschlämme als Sekundärrohstoffdünger bezeichnet werden. Werden Gärreste ausschließlich aus der Vergärung von pflanzlichem Material wie Mais und tierischen Ausscheidungen gewonnen, gelten diese als Wirtschaftsdünger (§2 II DüngG) (Anonymous, 2009a), was auf die meisten in Niedersachsen produzierten Gärreste zutrifft (Anonymous, 2014). Werden neben diesen Stoffen zusätzlich oder ausschließlich andere Gärsubstrate wie kommunale Bioabfälle oder Schlachtabfälle eingesetzt, handelt es sich um organische NPK-Dünger (Stickstoff-Phosphor-Kalium) (Anonymous, 2014). Klärschlämme werden in der Regel nicht als Substrate für Biogasanlagen eingesetzt, die anaerobe Vergärung wird in den Kläranlagen durchgeführt. Die Ausbringung von Klärschlamm als Dünger auf landwirtschaftlichen Flächen wird durch die Klärschlammverordnung (AbfKlärV) geregelt, es gelten jedoch die Bestimmungen des Düngemittelrechts (§3 I 1 AbfKlärV) (Anonymous, 2015c). Die Düngung mit Klärschlämmen ist nur zulässig, sofern sie laut AbfKlärV für eine Ausbringung zulässig sind und die Schwermetallgrenzwerte nicht überschritten werden (§3 I 2c, §4 VIII DüMV). Eine Ausbringungsmenge von 5 Tonnen Trockenmasse Klärschlamm je Hektar darf in 3 Jahren nicht überschritten werden (§6 I AbfKlärV). Die Vorgabe der Typenbezeichnung organischer Dünger als N-, P-, K-, NP-, NK-, PK- oder NPK-Dünger richtet sich nach den Nährstoffgehalten. Für einen Einnährstoffdünger muss der Nährstoffgehalt 3 % überschreiten, damit er als N-, P- oder K-Dünger bezeichnet werden darf. Für Zwei- oder Dreinährstoffdünger müssen die Gehalte 1 % N und 0,3 % P₂O₅, oder 0,5 % K₂O überschritten werden (Anlage 1 Abschnitt 3 DüMV). Je nach Nährstoffgehalt fällt Klärschlamm unter die Kategorie der organischen Dünger. Für Wirtschaftsdünger gilt laut Düngeverordnung eine nährstoffbezogene maximale Ausbringungsmenge, welche 170 kg N/ha*Jahr nicht überschreiten darf (§4 III 1 DüV). Wird diese Obergrenze eingehalten, wird der P-Bedarf der Pflanzen um ein Vielfaches überschritten, weshalb sich die obere Ausbringungsmenge an P

orientieren und 22 kg P/ha*Jahr nicht übersteigen sollte. Diese Menge entspricht dem durchschnittlichen Entzug durch die Ernte (Haneklaus et al., 2016).

In der Landwirtschaft fällt P in Gülle und Mist aus der Tierproduktion an, welche jedoch häufig regional konzentriert ist und den örtlichen Nährstoffbedarf übersteigt (Montag et al., 2015). Auf landwirtschaftlichen Flächen, auf denen zu viele Nährstoffe ausgebracht werden, besteht das Risiko der Auswaschung in Gewässer. Ein Überschuss an Nährstoffen kann zur Eutrophierung von Gewässern führen, welche besonders im Ostseeraum ein Problem darstellt (Schnug et al., 2001), da der Wasseraustausch mit der Nordsee begrenzt ist. Unter Eutrophierung versteht man das Anreichern von Nährstoffen in Gewässern, was zu vermehrtem Wachstum von Algen führen kann, wodurch das Gleichgewicht in Gewässern außer Balance geraten kann. Neben Stickstoff ist hauptsächlich P für Algenblüten verantwortlich (Conley et al., 2009), dessen größte Eintragsquelle in die Ostsee die Landwirtschaft ist (Schnug et al., 2001).

Für eine bedarfsgerechte Düngung ist es unerlässlich den Anteil an pflanzenverfügbaren Nährstoffen zu kennen, welcher durch den Anteil an löslichen Fraktionen des Düngers gekennzeichnet ist. Der pflanzenverfügbare P-Anteil von Düngern kann stark variieren. Während Rohphosphate einen hohen Gesamtposphorgehalt aufweisen, welcher jedoch wegen seiner geringen Löslichkeit schlecht pflanzenverfügbar ist, weisen Wirtschaftsdünger und Klärschlämme große Anteile an löslichem Phosphor auf (Kratz et al., 2010; Waida, 2014).

Viele Literaturangaben zu Nährstoffgehalten in Wirtschaftsdüngern und Klärschlämmen beziehen sich nur auf den Gesamt-P-Gehalt und nicht auf den pflanzenverfügbaren Nährstoffanteil, weshalb auf diesem Gebiet noch Forschungsbedarf besteht. Zudem sind Studien zu Nährstoffgehalten in Gärresten wie beispielsweise von Haber et al. (2008) und Wendland et al. (2012) oft regional auf ein Bundesland begrenzt und könnten somit regionale Unterschiede wie intensive Tierhaltung außer Acht lassen. Des Weiteren beziehen sich die meisten Studien auf Gärreste aus der Co-Fermentation von NawaRo mit Rinder- bzw. Schweinegülle. Über die Gärreste aus der Fermentation von Geflügelkot sind kaum Ergebnisse bekannt, da diese nur einen kleinen Teil der Biogasanlagen ausmachen (Haber et al., 2008; Scheftelowitz et al., 2015).

Für die Ermittlung der pflanzenverfügbaren P-Gehalte in Böden und Düngern existieren verschiedene Methoden. Zur Bestimmung der kurzfristig verfügbaren P-Anteile in Mineral- und Wirtschaftsdüngern wird eine Extraktion mit Wasser angewendet (Kleinman et al., 2005; Kratz et al., 2008, 2009). Für die Extraktion von kurz- und mittelfristig verfügbarem Phosphor in Böden wird die Calcium-Ammonium-Lactat-Extraktion (CAL) durchgeführt. In einem Projektbericht zu Inhaltsstoffen von Gärresten wurde die Anwendung der CAL-Extraktion zur Bestimmung von löslichen P-Anteilen in Gärresten beschrieben (Haber et al., 2008). Die CAL-Extraktion wurde auch zeitweise für Komposte eingesetzt (Bundesgütegemeinschaft Kompost e.V., 1998), wird heute jedoch nicht mehr für Dünger angewandt, da die CAL-Methode gemäß Düngemittelverordnung nicht zulässig für die Bestimmung der Phosphorlöslichkeit in Düngern ist (Anonymous, 2015d). In Düngern wird der lösliche P-Anteil mit der Neutral-Ammoniumcitrat-Extraktion (NAC) bestimmt (Anonymous, 2015e). Der Gesamt-P-Gehalt wird aus Mineralsäureaufschlüssen bestimmt. Für Gärreste aus Biogasanlagen gibt es keine vorgeschriebene P-Extraktionsmethode, je nach Art der Gärsubstrate werden Gärreste aus Biogasanlagen als Wirtschaftsdünger oder organischer Dünger eingeordnet. In der Düngemittelverordnung wird nicht festgelegt wie der pflanzenverfügbare P-Gehalt in Wirtschaftsdüngern zu bestimmen ist. Daher stellt sich die Frage, welche Extraktionsmethode (CAL- oder NAC-Extraktion) besser geeignet ist, die verfügbare P-Fraktion in Gärresten zu ermitteln, oder ob die Methoden vergleichbare Ergebnisse liefern.

Neben den verschiedenen Extraktionsmethoden stellt sich auch die Frage nach der optimalen Messmethode für die Extrakte. Nicht nur die Extraktion der P-Fractionen kann auf verschiedene Weise durchgeführt werden, auch die Messung kann durch unterschiedliche Methoden erfolgen. Durch die weite Verbreitung von Photometern wird der P-Gehalt üblicherweise durch eine kolorimetrische Anfärbung mit Ammoniumheptamolybdat bestimmt. Diese Methode ist jedoch störanfällig, so können verschiedene Ionen welche üblicherweise in Boden-, Pflanzen-, und Gärrestproben enthalten sind (Fe-, Al-, Mn-, Ca-, K-, Mg-, Na- und NO₃-Ionen) die Anfärbung beeinträchtigen (Kowalenko et al., 2007). Eine Alternative bietet die Quantifizierung mittels ICP-OES (inductively coupled plasma optical emission spectrometry), bei der die Probe in einem induktiv gekoppelten Plasma verdampft und der P ionisiert wird. Ein Vorteil der ICP-OES-Messung besteht darin, dass auch

organisch gebundener P erfasst werden kann, da die organischen Bestandteile in der Hitze des Plasmas zerstört werden und der P ionisiert werden kann. Bei der photometrischen Bestimmung ist dies nicht möglich, da organisch gebundener P nicht angefärbt wird (Matula, 2010; Nathan et al., 2002; Paz-Ferreiro et al., 2012; Pittman et al., 2005).

Um Stoffkreisläufe zu schließen und natürliche Phosphorreserven zu schonen sollten alle P-Quellen wie Wirtschaftsdünger, Gärreste, Klärschlämme oder Knochenmehle genutzt werden. Bei der Schließung von Stoffkreisläufen muss darauf geachtet werden, dass keine unerwünschten Kontaminanten in den Kreislauf gelangen und akkumuliert werden. Der Grundsatz der Unbedenklichkeit ist in der Düngemittelverordnung festgelegt, wonach Dünger nur ausgebracht werden dürfen, wenn sie die Fruchtbarkeit des Bodens, die Gesundheit von Menschen, Tieren und Nutzpflanzen nicht schädigen und den Naturhaushalt nicht gefährden (§3 I 1 DüMV).

In Wirtschaftsdüngern und Klärschlämmen können verschiedene in der Umwelt wirksame Substanzen enthalten sein. Zu ihnen zählen unter anderen endokrine Substanzen, Antiparasitika, Antibiotika und Schwermetalle (Carballa et al., 2004; Müller, 2006; Ratsak et al., 2013). Unter endokrin wirksamen Substanzen versteht man Stoffe, welche eine hormonelle Wirkung aufweisen. Dieser Substanzklasse gehören Steroide wie beispielsweise Estradiol an, welches in Verhütungsmitteln eingesetzt wird und nach Ausscheidung durch den Menschen in Abwässer und Klärschlämme gelangt (Hensel, 2006). Östrogene, zu denen auch Estradiol zählt, können in Gewässern auf eine Vielzahl von Organismen wirken und haben häufig einen schädlichen Einfluss auf die Reproduktion (Campbell et al., 2006). Antiparasitika wie Abamectin und Ivermectin werden in der Nutztierhaltung verwendet und gelangen über kontaminierte Wirtschaftsdünger in die Umwelt, wo sie eine Vielzahl von Arthropoden schädigen können (Halling-Sørensen et al., 1998). Antibiotika wurden bis Ende der 1990er Jahre zur Wachstumsförderung in der Tiermast eingesetzt, diese Praxis ist seit 1999 in der Europäischen Union verboten. Seitdem dürfen Antibiotika nur noch zu veterinärmedizinischen Zwecken eingesetzt werden (Casewell et al., 2003). In der Umwelt können Antibiotika sowohl akute toxische Effekte auf Pflanzen, Wasser- und Bodenorganismen haben als auch zur Resistenzbildung von Mikroorganismen beitragen (Dalla Bona et al., 2015; Ding et al., 2010; Migliore et al., 2003). Aufgrund ihrer breiten Anwendung in der Human-

und Veterinärmedizin und ihrer potentiellen Umweltrisiken, wurden in dieser Studie Antibiotika aus den möglichen Kontaminanten von Wirtschaftsdüngern und Klärschlämmen ausgewählt, um näher untersucht zu werden.

Im Jahr 2014 wurden in Deutschland 121 t Sulfonamide, 342 t Tetracycline und 12,3 t Fluorchinolone an Tierärzte abgegeben. Während sich die Abgabemengen von Sulfonamiden und Tetracyclinen im Vergleich zum Jahr 2011 um 64 t (-34 %) und 222 t (-39 %) reduziert haben, stieg der Verbrauch von Fluorchinolonen um 4,1 t (+50 %) an (Anonymous, 2016d). Die Verwendung von Fluorchinolonen wird wegen ihrer besonderen Bedeutung für die Humanmedizin kritisch gesehen (Anonymous, 2016b).

Antibiotika verlassen Tiere zu 17 – 90 % unverändert oder als aktive Metaboliten, welche sich in den Ausscheidungen wiederfinden (Sarmah et al., 2006; Widyasari-Mehta et al., 2016). In Gärresten aus Biogasanlagen können ebenfalls Antibiotika-Rückstände enthalten sein, da die meisten Biogasanlagen als Eingangssubstrat eine Mischung aus Wirtschaftsdünger und nachwachsenden Rohstoffen wie Mais verwenden (Haber et al., 2008). Antibiotika können abhängig von ihrer Substanzklasse während der anaeroben Vergärung nur partiell abgebaut werden und können somit in den Gärresten enthalten sein. Sulfamethazin und Dichlorphenol erwiesen sich während der anaeroben Vergärung im Labormaßstab als sehr stabil, während Ampicillin, Florfenicol, und Tylosin nach weniger als 10 Tagen abgebaut wurden (Mitchell et al., 2013). Bei der Vergärung von Rindergülle verringerte sich die Konzentration von extrahierbarem Chlortetracyclin nach 33 Tagen um 75 % (Arikan, 2008), was zugleich eine Schwierigkeit der Extraktion aufzeigt. Antibiotika adsorbieren gegebenenfalls sehr stark an Matrixbestandteile, wodurch häufig nicht die Gesamtmenge Antibiotika extrahiert werden kann. In einem semi-kontinuierlichen Fermentersystem, dessen Substrat Tetracyclin enthielt, wurde im Gärrest eine geringere Tetracyclinkonzentrationen als im Substrat festgestellt. Es ist jedoch unklar ob die Reduktion auf dem Abbau von Tetracyclin basiert, oder einer irreversiblen Bindung an die Matrixbestandteile (Cetecioglu et al., 2013). In einer anderen Studie, in der der Abbau von Oxytetracyclin und Chlortetracyclin durch die anaerobe Fermentation von Schweinegülle untersucht wurde, verringerten sich die Konzentrationen der Antibiotika nach 21 Tagen um 68 bzw. 90 %. Gleichzeitig wurde eine teilweise Umwandlung der Tetracycline in ihre jeweiligen Epimere beobachtet,

welche eine geringere antibiotische Wirksamkeit aufweisen (Álvarez et al., 2010). Das 4-Epi-Tetracyclin weist nur noch 4 % der Wirksamkeit des Tetracyclins auf (Schedl, 2000). Es wird davon ausgegangen, dass Gärreste niedrigere Antibiotikakonzentrationen als die zur Fermentation eingesetzten Güllen enthalten. Gründe hierfür sind Biotransformation, irreversible Adsorption an Matrixbestandteile und nicht zuletzt eine Verdünnung der Gülle mit Co-Substraten wie Mais (Widyasari-Mehta et al., 2016). Entgegen dieser Annahme fand Ratsak et al. (2013) in Gärresten im Median höhere Wirkstoffkonzentrationen als in den Güllen. Die Antibiotikakonzentrationen in Gülle und Gärresten bewegen sich im Bereich von wenigen µg bis 300 mg/kg Trockenmasse (Ratsak et al., 2013; Widyasari-Mehta et al., 2016).

Hinsichtlich der Analytik der Antibiotika gibt es keine standardisierte Methode mit der alle gängigen Antibiotika gleichzeitig erfasst werden können. Das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) unterteilt Veterinärantibiotika in 16 verschiedene Klassen (Anonymous, 2015a). Eine Methode zu entwickeln, mit welcher alle gängigen Antibiotika gleichzeitig mit einer hinreichenden Messgenauigkeit bestimmt werden können, ist nicht möglich. Die Analytik erfolgt in der Regel per LC-MS im MRM-Modus (Multiple Reaction Monitoring), welcher in der Lage ist auch Spurenkonzentrationen zu detektieren, hierfür müssen die Analyten jedoch im Vorfeld festgelegt werden (Jacobsen et al., 2006; Ratsak et al., 2013). Analyten, welche nicht in der Vorauswahl eingeschlossen sind, können somit im MRM-Modus nicht detektiert werden, wodurch Gärreste fälschlicherweise als Antibiotika-frei eingestuft werden könnten. Zudem ist es schwierig eine Extraktionsmethode zu entwickeln, welche für verschiedene Wirkstoffklassen gleichermaßen gut funktioniert. Selbst die Wiederfindungsraten der Substanzen innerhalb einer Wirkstoffklasse können mit der gleichen Extraktionsmethode stark variieren (Jacobsen & Halling-Sorensen, 2006). Des Weiteren hängt die Effizienz der Extraktion von der Bindung an Matrixbestandteile ab, welche sich sogar bei der Extraktion von sechs verschiedenen Schweinegüllen erheblich unterscheiden kann (Jacobsen & Halling-Sorensen, 2006). Die Extraktions- und Messmethode muss demnach an die zu untersuchenden Proben und Analyten angepasst werden, um zufriedenstellende Ergebnisse zu erzielen.

Wirtschaftsdünger können neben schädlichen chemischen Substanzen Krankheitserreger (Pathogene) enthalten, welche durch die Düngung auf Ackerflächen gelangen. Neben Salmonellen wurden hauptsächlich Clostridien kritisch betrachtet, da diese während der anaeroben Vergärung unter den üblichen Prozessparametern nicht abgetötet werden und sich unter bestimmten Bedingungen potentiell vermehren könnten (Messelhäußer, 2015). Clostridien und manche Bacillus-Arten können zudem widerstandsfähige Sporen oder Zysten bilden, wodurch theoretisch die Möglichkeit besteht, dass das Gärprodukt hygienisch nicht einwandfrei ist (Lebuhn et al., 2016). Tatsächlich trägt die anaerobe Vergärung dazu bei, bestimmte Tier- als auch Pflanzenpathogene zu reduzieren. Während einige Pathogene viele Wochen in gelagerter Gülle überleben können, werden sie durch die anaerobe Vergärung schon nach einigen Tagen reduziert (Al Seadi et al., 2012; Lebuhn et al., 2016). Frühere Bedenken, anaerobe Pathogene wie Clostridien könnten sich in Biogasanlagen vermehren, bestätigten sich nicht. Stattdessen wurde in ausführlichen Reviews dargelegt, dass die anaerobe Vergärung zu einer Reduktion von Pathogenen führt (Lebuhn et al., 2016; Messelhäußer, 2015).

Schwermetalle stellen eine Klasse von Kontaminanten dar, welche in Stoffkreisläufen besonders kontrolliert werden sollten, da sie im Gegensatz zu organischen Kontaminanten nicht abgebaut werden und sich im Boden akkumulieren können. Insbesondere Schweinegülle weist hohe Gehalte an Kupfer und Zink auf, welche ein Vielfaches über denen von Rindergülle liegen. Dementsprechend finden sich auch in Gärresten aus Biogasanlagen zum Teil hohe Kupfer- und Zink-Gehalte, die Konzentrationen anderer Schwermetalle sind weniger kritisch (Haber et al., 2008). Wirtschaftsdünger tragen im bundesweiten Mittel zu >45 % des Zinks, 70 % des Kupfers und 45 % des Nickels bei, welche auf landwirtschaftlichen Flächen ausgetragen werden (Müller, 2006). Klärschlämme, welche ebenfalls auf landwirtschaftlichen Flächen ausgebracht werden, enthalten Schwermetalle in höheren Konzentrationen als Wirtschaftsdünger und Klärschlämme (Anonymous, 2016a; Haber et al., 2008; Kratz et al., 2005). Schwermetalle finden sich auch in konventionellen Mineraldüngern, besonders P-Dünger sind je nach Herkunftsland mit Cadmium und Uran belastet (Kratz et al., 2006; Schnug et al., 2015). Bezogen auf den Phosphorgehalt enthalten Wirtschaftsdünger und Klärschlamm geringere Anteile an Arsen, Cadmium, Chrom und Uran als Mineraldünger, sie enthalten jedoch höhere Gehalte an Kupfer, Nickel, Blei und Zink (Kratz & Schnug, 2005).

Schwermetalle sind demnach in allen Düngerarten vorhanden und sollten regelmäßig analysiert werden, um eine übermäßige Ausbringung auf landwirtschaftliche Flächen zu vermeiden.

Antibiotika halten sich je nach Strukturklasse im Boden Wochen bis hin zu mehr als sechs Monaten (Thiele-Bruhn, 2003). Die Literaturangaben der Abbauraten von Antibiotika im Boden sind sehr unterschiedlich und sind abhängig von der Substanzklasse, Temperatur, Adsorption und teilweise von der Bodenart. Sulfonamide bauten sich im Boden nach 60 Tagen zu 80 – 90 % ab, während die Konzentration von Tetracyclinen auch nach 180 Tagen unverändert war (Sittig et al., 2014; Thiele-Bruhn, 2003). Der Abbau ist von den Versuchsbedingungen abhängig, während Chlortetracyclin in mit Gülle gedüngtem Boden bei 4 °C nicht abgebaut wurde, fand bei 30 °C ein Abbau von 56 % statt (Gavalchin et al., 1994). Die Bodenart in die das Antibiotikum eingebracht wird, kann je nach Substanzklasse einen Einfluss auf die Abbaurate haben. Das β -Lactam Cefiotur weist beispielsweise in Tonlehm eine Halbwertszeit von 22 Tagen auf, während diese in Sand bei 49 Tagen liegt. Die Abbauraten von Sarafloxacin in verschiedenen Bodenarten unterschieden sich jedoch nur gering (Thiele-Bruhn, 2003). Der Abbau im Boden ist davon abhängig wie stark die Adsorption an ihn ist, wobei stark gebundene Antibiotika langsamer abgebaut werden (Sittig et al., 2014). Maßgeblich für den Abbau sind Mikroorganismen im Boden (Martens et al., 1996). Es spielen jedoch noch andere Abbauewege eine Rolle. Fluorchinolone können beispielsweise durch UV-Strahlung zersetzt werden. Dieser Abbaueweg findet jedoch hauptsächlich in Wasser statt, da die UV-Strahlung keine große Eindringtiefe in den Boden aufweist (Migliore et al., 2003). Da der Abbau von Antibiotika im Boden von sehr vielen Faktoren abhängt, ist es nur schwer möglich allgemeingültige Aussagen darüber zu treffen, in welchem Zeitraum Antibiotika vollständig abgebaut werden.

Antibiotika und Schwermetalle, welche durch Düngung ausgebracht werden, können in der Umwelt toxisch wirken. Schwermetalle können den Chlorophyllgehalt von Pflanzen senken, das Wachstum und die Enzymaktivität verringern und die Keimung hemmen (Fargašová, 2001, 2004; Nagajyoti et al., 2010). Antibiotika wirken ebenfalls wachstumshemmend auf Pflanzen und führen zu morphologischen Veränderungen bei Pflanzen (Michelini et al., 2012). Pflanzenarten können unterschiedlich auf Antibiotika reagieren, was eine Übertragung der toxikologischen Ergebnisse von

einer Art auf eine andere erschwert. Beispielsweise unterscheidet sich die Effektkonzentration für Wurzelinhibierung durch zwei verschiedene Sulfonamide zwischen Reis und Gurke um den Faktor 6 – 30 (Liu et al., 2009).

Neben direkten toxischen Effekten auf Nutzpflanzen können sowohl Schwermetalle als auch Antibiotika durch Pflanzen aus dem Boden aufgenommen werden und somit in die Nahrungskette gelangen, wodurch sie ein Risiko für den Menschen darstellen können (Badea et al., 2013; Boxall et al., 2006; Kang et al., 2013). Zudem können durch Antibiotika Bodenorganismen geschädigt und deren Zusammensetzung verändert werden (Chessa et al., 2016). Bodenmikroorganismen sind wichtig für den Abbau organischer Substanz und die Mineralisierung des Bodens (Kumar et al., 2005). Bei einer Störung des mikrobiellen Gleichgewichts im Boden könnte es zu negativen Effekten auf die Nährstoffversorgung von Pflanzen kommen. Abgesehen von den Risiken durch Kontaminanten haben organische Dünger im Vergleich zur Düngung mit Mineraldüngern eine positive Wirkung auf die Anzahl von Bodenorganismen wie Regenwürmern, Springschwänzen oder Laufkäfern (Walter et al., 2012). Durch Regenfälle können Antibiotika aus dem Boden in Gewässer und Grundwässer gelangen (Hamscher et al., 2003). Vor allem Sulfonamide werden im Vergleich zu Fluorchinolonen und Tetracyclinen nur schlecht im Boden gebunden und sind somit mobil (Thiele-Bruhn, 2003). In Gewässern schädigen Antibiotika und Schwermetalle Organismen wie Wasserflöhe und Mikroalgen (Dalla Bona et al., 2015; Halling Sørensen, 2000; Sorvari et al., 1996).

Häufig treten Schadstoffe in Kombination auf. Beispielsweise kann Klärschlamm neben Schwermetallen verschiedene pharmazeutisch wirksame Substanzen enthalten (Fliessbach et al., 1994; Martin et al., 2014), Gärreste aus Biogasanlagen weisen häufig eine Mehrfachkontamination mit verschiedenen Antibiotika auf (Ratsak et al., 2013). Für die toxikologische Folgenabschätzung dürfen Mehrfachkontaminationen nicht außer Acht gelassen werden, da sich toxische Wirkungen von Einzelsubstanzen in Kombination sowohl verstärken als auch abschwächen können. Synergistische toxische Effekte, bei denen sich die toxische Wirkung in Kombination verstärkt, wurden bei der Wachstumshemmung von Cyanobakterien und Grünalgen durch die Antibiotika Amoxicillin, Levofloxacin, Norfloxacin und Tetracyclin oft beobachtet. Fast alle Kombinationen mit Tetracyclin zeigten synergistische toxische Effekte (González-Pleiter et al., 2013).

Mikroalgen zeigten bei der Kombination von Trimethoprim und Sulfamethoxazol eine stärkere Wachstumsinhibierung als durch die Einzelsubstanzen, die Kombination der Antibiotika Ampicillin und Cefazolin zeigte keine Wachstumsinhibierung (Eguchi et al., 2004). In Kombination können Substanzen auch additive oder antagonistische Effekte aufweisen. Bei additiven Effekten wird die toxische Wirkung von Einzelsubstanzen in ihrer Kombination weder abgeschwächt noch verstärkt, ein Antagonismus liegt vor, wenn die Kombination weniger toxisch wirkt. Additive und antagonistische toxische Effekte wurden bei der Kombination verschiedener Antibiotika auf den Wasserfloh *Daphnia magna* beobachtet (Dalla Bona et al., 2014).

Die toxische und kombinatorische toxische Wirkung lässt sich nicht auf die Klasse der Antibiotika verallgemeinern und hängt zum Teil spezifisch von den untersuchten Substanzen ab (Christensen et al., 2006). Außerdem hängt die Wirkungsweise von dem untersuchten Organismus ab. Während Oxytetracyclin und Flumequin in Kombination eine antagonistische toxische Wirkung auf die Süßwasseralge *Pseudokirchneriella subcapitata* haben, ist die Wirkungsweise auf Klärschlamm Bakterien synergistisch (Christensen et al., 2006). Da die Wirkmechanismen organismus- und substanzspezifisch sind, ist es oft nicht möglich allgemeine Voraussagen hinsichtlich der Kombinationstoxikologie zu treffen.

Der Einsatz von Antibiotika kann die Ausbildung von Resistenzen bei Mikroorganismen fördern, wodurch Antibiotika ihre Wirkung auf diese verlieren, was wiederum die Behandlung von Infektionen erschwert (Levy et al., 2004). Resistente Mikroorganismen können sowohl direkt mit kontaminierter Gülle ausgebracht werden, als auch im Boden durch selektiven Druck in Anwesenheit von Antibiotika entstehen (Chessa et al., 2016; Heuer et al., 2008). Durch horizontalen Gentransfer, bei dem Mikroorganismen Resistenzgene direkt austauschen, können diese in der Umwelt weiterverbreitet werden (Heuer et al., 2008; Levy & Marshall, 2004).

Zielsetzung dieser Arbeit war es, verschiedene Extraktionsmethoden für lösliche P-Fractionen auf Wirtschaftsdünger und Gärreste aus Biogasanlagen anzuwenden und zu vergleichen. Des Weiteren sollten die Einflüsse verschiedener Probenaufarbeitungen auf die P-Extraktion untersucht werden, da es Hinweise darauf gibt, dass sich P-Fractionen durch Trocknung verändern können (Ajiboye et al., 2004). Hinsichtlich der Antibiotika sollte bestimmt werden, wie häufig und in welchen Konzentrationen ausgewählte Antibiotika in Wirtschaftsdüngern und

Klärschlämmen in Substraten und Endprodukten der anaeroben Fermentation vorhanden sind. Aus den gewonnenen Daten sollte veranschaulicht werden, welche Antibiotika-Frachten durch fachgerechte Düngung auf Ackerflächen ausgebracht werden könnten. Zusätzlich sollten Toxizitätstests in Form von verschiedenen Toxkits und einem Hydrokultur- und Gefäßversuch durchgeführt werden, um das Risiko der zu erwartenden Frachten für die Umwelt zu ermitteln und um eine Aussage hinsichtlich der ökologischen Relevanz der verschiedenen Kontaminationen zu ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Herkunft des Probenmaterials

Die Probenahmen erfolgten zwischen Juli 2014 und März 2015. Bei den beprobten Anlagen handelte es sich um kontinuierlich arbeitende Biogasanlagen und Kläranlagen in Deutschland, Finnland und Schweden. Es wurden sowohl die Eingangssubstrate wie Wirtschaftsdünger und Klärschlamm beprobt als auch die Endprodukte der Biovergasung. Des Weiteren wurde eine Biogasanlage beprobt, welche weder Wirtschaftsdünger noch Klärschlamm als Substrat verwendete und somit frei von Antibiotika sein sollte. Dieses Material wurde eingesetzt, um eine korrekte Bestimmung der Wiederfindungsraten für die Antibiotikaanalytik zu ermöglichen und die Extraktionsmethode zu optimieren.

Wie in der Literatur beschrieben (VDLUFA, 2000b), wurden jeweils 10 L bei flüssigen und 10 kg Probe bei festen Proben abgefüllt, um die Homogenität sicherzustellen. Bei flüssigen Proben wurden die ersten 20 L verworfen, bevor die Probe abgefüllt wurde, um abgestandenes Probenmaterial aus den Auslässen zu spülen, während für feste Proben Teilproben von mindestens fünf verschiedenen Stellen eines Schütthaufens genommen wurden. Nach dem Transport wurden die Proben gründlich homogenisiert und eine Teilprobe in einer Aluminiumschale eingefroren.

Die finnischen und schwedischen Proben wurden in den jeweiligen Forschungsinstituten vor Ort bei -20 °C eingefroren und dort bis zum Ende der Probenahmekampagne gelagert. Der Transport nach Deutschland erfolgte in isolierten Paketen, um ein Auftauen der Proben zu verhindern.

Sämtliche Proben wurden gefriergetrocknet und anschließend mit einer Scheibenschwingmühle vermahlen. Die Substrate der Biogasanlagen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Substrate der beprobten Anlagen aus Finnland, Schweden und Deutschland (pflanzliche Substrate sind nicht aufgeführt)

Finnland		Schweden		Deutschland	
Nr.	Substrate	Nr.	Substrate	Nr.	Substrate
1	Rindergülle, Geflügelkot	1	Rindergülle Schweinegülle	1	Nur pflanzliches Material
2	Rindergülle	2	Geflügelkot, Schweinegülle	2	Rindergülle, Geflügelkot
3	Rindergülle	3	Klärschlamm	3	Rindergülle, Schweinegülle
4	Rindergülle	4	Klärschlamm	4	Geflügelkot
5	Schweinegülle, Rindergülle	5	Rindergülle, Schweinegülle, Geflügelkot	5	Geflügelkot
6	Schweinegülle	6	Klärschlamm	6	Geflügelkot,
7	Schweinegülle			7	Klärschlamm
8	Schweinegülle			8	verschiedene Reststoffe
9	Klärschlamm, Schweinegülle			9	Rindergülle
10	Klärschlamm			10	Klärschlamm
11	Klärschlamm			11	Rindergülle
12	Klärschlamm			12	Schweinegülle
13	Klärschlamm				
14	Klärschlamm				

2.2 Phosphorlöslichkeit der Eingangssubstrate und des Gärrests einer Biogasanlage

2.2.1 Experiment zur Bestimmung der Phosphorextrahierbarkeit in unterschiedlichen Substraten in Abhängigkeit von der Probenaufbereitung

An einem Hühnertrockenkot und Gärrest einer Biogasanlage wurde untersucht, inwieweit sich gängige Methoden zur Bestimmung der P-Extrahierbarkeit in Böden und Komposten eignen, den pflanzenverfügbaren P-Gehalt auch in Gärresten sowie deren Eingangssubstraten zu bestimmen. Dabei sollte ermittelt werden, ob sich Gärreste vergleichbar zu organischen Materialien (hier Hähnchenkot) verhalten und welchen Einfluss die Probenvor- und -aufbereitung auf das Ergebnis hat. Zusätzlich sollten die Ergebnisse der Co-Substrate und Prozessschritte zeigen, inwiefern sich die Pflanzenverfügbarkeit der P-Fraktion während des Vergärungsprozesses verändert.

Die Proben für die Analytik der verschiedenen Phosphor-Extraktionsmethoden stammten von einer kontinuierlich arbeitenden Biogasanlage, welche Mais (56,8 %), Zuckerrübenschnitzel (13,6 %) und Hähnchenkot (29,6 %) als Substrate einsetzte. Es wurden sowohl die Eingangssubstrate und Prozessschritte als auch die Endprodukte beprobt, um Veränderungen der P-Extrahierbarkeit während des Prozesses abbilden zu können (Abbildung 1).

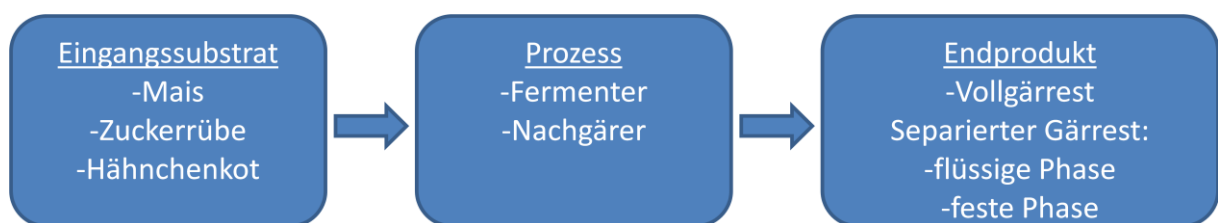


Abbildung 1: Schema der Probenahme der Biogasanlage für die Phosphoranalytik

Die Proben wurden gemäß Abbildung 2 aufgearbeitet und extrahiert. Zunächst wurde eine Hälfte des Probenmaterials mit einem Küchenmixer homogenisiert und zerkleinert, während die andere Hälfte nicht zerkleinert wurde, um die ursprüngliche Struktur und Partikelgröße beizubehalten. Die zerkleinerten und unzerkleinerten

Proben wurden weiter portioniert und entweder bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet, eingefroren oder als Frischmaterial für die Analysen abgefüllt. Die gefrorenen Proben wurden nach einigen Wochen kurz vor der Analyse wieder aufgetaut und direkt extrahiert. Die bei 40 °C getrockneten Proben wurden sowohl direkt analysiert als auch mit der Scheibenschwingmühle feinvermahlen und anschließend extrahiert. Aus diesen vermahlene Proben wurde zusätzlich zu der Wasser- und CAL-Extraktion, die an allen Proben vorgenommen wurde, auch eine NAC-Extraktion durchgeführt. Das Wiederbefeuchten der getrockneten Proben gestaltete sich z.T. schwierig, da das leichte organische Material auf der Extraktionslösung treiben kann. Daher wurde eine zusätzliche Variante getestet, bei der getrocknetes Material eingeweicht wurde. Hierbei wurden getrocknete Proben 3 Tage vor der Extraktion mit 3 mL Wasser eingeweicht, um die Proben wieder in einen Zustand zu versetzen, der dem frischen Zustand ähnelte.

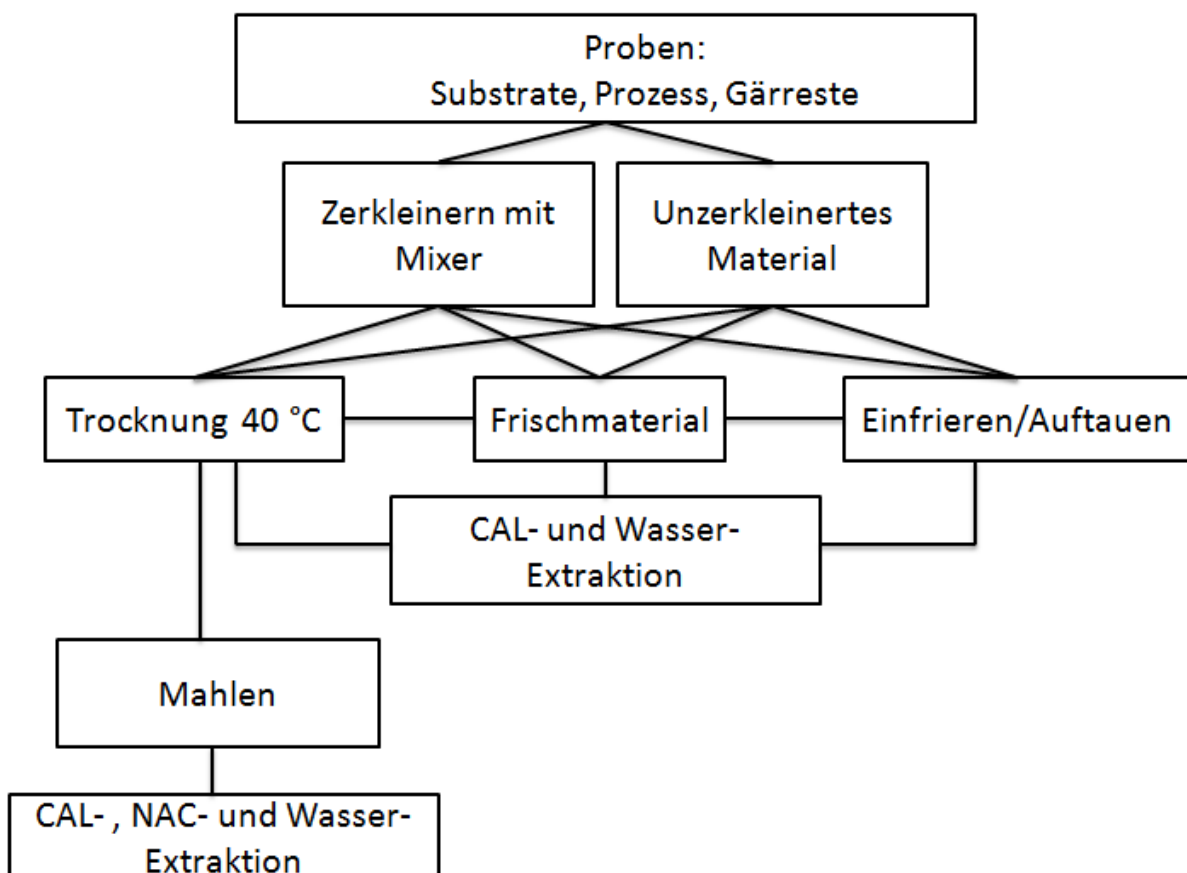


Abbildung 2: Schema der verschiedenen Probenaufarbeitungen für die Phosphoranalytik

Tabelle 2: Lösliche Phosphorfraktionen verschiedener Extraktionsmittel (verändert nach Kratz und Schnug 2009)

Extraktionsmittel	Substrat	P-Fraktion
Wasser (W)	Düngemittel (VDLUFA, 1995b)	Monocalciumphosphat (MCP) $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Ammoniumphosphat
Neutrales Ammoniumcitrat (NAC)	Düngemittel (VDLUFA, 1995a)	MCP, Dicalciumphosphate (DCP) ca. 80 % der Al-/Fe-Phosphate, basisches Ca-Phosphat (Hydroxylapatit/Tricalciumphosphat) bzw. ungelöster oder bei der Ammonisierung rückgebildeter Rohphosphat- Rückstand, Apatit in Abhängigkeit von der Carbonatsubstitution im Apatitkristall bzw. dem Anteil an freiem Carbonat im Rohphosphat
Calcium- Ammonium-Lactat (CAL)	Boden (Schüller, 1969) Kultursubstrat, Kompost (Bundesgütegemeinschaft Kompost e.V., 1998) Gärrest (Haber et al., 2008) Gülle (Institutsinterne Methodenvorschrift)	MCP, DCP, Ca-Phosphate
Königswasser	Sekundärrohstoffdünger, Kultursubstrate (VDLUFA, 2000a)	Gesamt-P

Die angewendeten Extraktionsmethoden (Tabelle 2) unterscheiden sich in ihrer Wirksamkeit verschiedene P-Fractionen zu lösen. Das schwächste Extraktionsmittel ist Wasser, welches Monocalciumphosphat, Calciumdihydrogenphosphat und Ammoniumphosphat löst. Es ist am besten geeignet kurzfristig pflanzenverfügbare P-

Fraktionen zu lösen. Neutrales Ammoniumcitrat (NAC) und CAL lösen zusätzlich Dicalciumphosphat und Calcium-Phosphate und bilden kurz- und mittelfristig verfügbare P-Fraktionen ab. Der Gesamtphosphorgehalt wurde aus einem Totalaufschluss mit Königswasser bestimmt.

Prinzipiell ist es möglich den Phosphorgehalt in den Extrakten durch verschiedene Methoden wie Gravimetrie, Kolorimetrie oder Flammenspektroskopie zu ermitteln. In dieser Arbeit wurde die kolorimetrische Anfärbung als Molybdänblau-Komplex mit der Messung mittels ICP-OES verglichen, da diese Methoden die derzeit gebräuchlichsten darstellen. Die meisten Literaturdaten basieren auf der kolorimetrischen Anfärbung, welche schon von Schüller 1969 verwendet wurde. In den letzten Jahrzehnten wurde die Messung per Flammenspektrometrie immer bedeutender, da die Messung schneller ist und mehrere pflanzenbaulich relevante Nährstoffe gleichzeitig erfasst werden können (Kowalenko & Babuin, 2007; Nathan et al., 2002; Sikora et al., 2005)

In den Vorschriften der einzelnen Extraktionsmethoden sind die Probeneinwaagen vorgegeben. Diese mussten für den vorliegenden Versuch angepasst werden, da sowohl getrocknetes als auch frisches Probenmaterial untersucht werden sollte. Dafür musste die gleiche Menge an Trockenmasse eingewogen werden, um die Ergebnisse direkt miteinander vergleichen zu können. Für die Extraktion von frischem Kompostmaterial sollen 20 g der Probe mit 200 mL CAL-Extraktionslösung extrahiert werden (Bundesgütegemeinschaft Kompost e.V., 1998), während sich für Gülle ein Verhältnis von 40 g Frischgülle auf 100 mL CAL-Lösung in internen Versuchen als praktikabel erwiesen hat. Die NAC-Extraktion soll mit 1 g getrockneter Probe und 100 mL Extraktionslösung durchgeführt werden (VDLUFA, 1995a). Es zeigte sich, dass Einwaagen von >10 g Frischmaterial auf 100 mL Extraktionsmittel bei CAL- und NAC-Lösung in Kombination mit Gärrest- und Gülleproben zu einer starken Gas- und Schaumentwicklung führten. Um ein Überschäumen der Probe zu verhindern musste ein kleineres Verhältnis als 1:10 von Frischmasse zu Extraktionsmittel gewählt werden. Frisches Probenmaterial weist hohe und zum Teil sehr unterschiedliche Wassergehalte auf, weswegen es entscheidend war das Verhältnis von Trockenmasse zu Extraktionslösung konstant zu wählen. Da die Probe mit dem geringsten Trockenmasseanteil nur 7,6 % Trockenmasse enthielt und die Einwaage von Frischmaterial auf 100 mL Extraktionslösung 10 g nicht

übersteigen sollte, wurde eine Einwaage von 0,5 g Trockenmasse auf 100 mL Extraktionslösung gewählt. Für die Einwaagen der frischen Proben wurde der Trocknungsverlust einberechnet und das Äquivalent von 0,5 g Trockenmasse als Frischmasse eingewogen.

2.2.2 Wasserlösliche Phosphorfraktionen (H₂O) (VDLUFA, 1995b)

Für die Bestimmung der wasserlöslichen Phosphoranteile wurde das Äquivalent von 0,5 g Trockenmasse der Probe in einer 250 mL PE-Flasche eingewogen und mit 100 mL dest. Wasser versetzt. Die Mischung wurde 30 min in einem Horizontalschüttler bei 130 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Der Extrakt wurde durch einen Sartorius 292 Filter in eine 100 mL PE-Flasche filtriert und der pH-Wert durch Zugabe von konzentrierter Salpetersäure auf pH 3 eingestellt. Falls nötig wurden die Proben vor dem Filtrieren bei 9000 g 5 min zentrifugiert, um ein Verstopfen des Filters zu verhindern.

Die Stammlösung der kolorimetrischen Phosphor-Bestimmung wurde hergestellt indem 20 g Ammoniumheptamolybdat-tetrahydrat und 0,5 g Kaliumantimon(III)oxidtartrat-hemihydrat in 450 mL H₂SO₄ (10 M) gelöst und mit dest. Wasser auf 1 L aufgefüllt wurden. Zur Aktivierung der Lösung wurden 1,5 g Ascorbinsäure zu 100 mL Stammlösung gegeben. Bei der Anfärbung wurden 5 mL der aktivierten Stammlösung in einen 50 mL Messkolben gegeben und mit 20 mL dest. Wasser vermischt. Ein Äquivalent des wässrigen Extrakts wurde hinzugegeben, welches bei Hähnchenkot und Gärrestproben bei etwa 0,5 mL liegt, bei Proben mit geringerem Phosphorgehalt wie Mais oder Zuckerrübe bei bis zu 5 mL. Anschließend wurden die Kolben bis zur Marke aufgefüllt. Die Proben wurden nach einer Anfärbezeit von 60 min bei der Wellenlänge 882 nm mit einem Perkin Elmer Lambda 35 UV/VIS Spektrometer gemessen. Die Konzentrationen der verwendeten Kalibriergerade waren 0,1, 0,2, 0,4 und 0,8 mg/L P.

2.2.3 Neutral-Ammonium-Citrat Extraktion (NAC) (VDLUFA, 1995a)

Die NAC-Extraktionslösung enthält 846 g Citronensäure (wasserfrei), welche in einem 5 L Messkolben in etwa 2 L dest. Wasser gelöst wurden. Unter Kühlung im Wasserbad wurden 950 mL Ammoniaklösung (25 %ig) zugefügt. Nach Auffüllen auf etwa 4 L wurde der pH-Wert mit Ammoniaklösung oder Citronensäurelösung auf pH 7 eingestellt und mit dest. Wasser auf 5 L aufgefüllt. Es wurde 1 g der bei 40 °C getrockneten, gemahlene Probe in einen 200 mL Iodzahlkolben eingewogen, 100 mL der NAC-Extraktionslösung hinzugegeben und der Kolben mit einem Stopfen verschlossen. Der Kolben wurde in dem auf 65 °C vorgeheizten Schüttel-Wasserbad eine Stunde geschüttelt. Der Extrakt wurde in einen 500 mL Messkolben überführt und mit dest. Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde durch einen Faltenfilter (Sartorius 292) in eine 100 mL PE-Flasche filtriert, der restliche Extrakt wurde verworfen. Die Anfärbung der Extrakte erfolgte wie bei den Wasser-Extrakten unter 2.2.2 beschrieben.

2.2.4 Calcium-Ammonium-Lactat Extraktion (CAL) (Schüller, 1969)

Für die CAL-Extraktionslösung wurden 77 g Calciumlactat ($C_6H_{10}CaO_6 \times 5H_2O$) und 39,5 g Calciumacetat ($Ca(CH_3COO)_2 \times H_2O$) in heißem dest. Wasser gelöst, nach dem Abkühlen in einen 5 L Messkolben überführt, mit 89,5 mL konzentrierter Essigsäure versetzt und mit dest. Wasser aufgefüllt. Es wurde das Äquivalent von 0,5 g Trockenmasse der Probe in einer 250 mL PE-Flasche eingewogen und mit 100 mL CAL-Extraktionslösung versetzt. Die Mischung wurde für 60 min in einem Horizontalschüttler (130 Umdrehungen/min) geschüttelt und anschließend in eine 100 mL Flasche filtriert (Sartorius 292 Filter).

Für die kolorimetrische Anfärbung wurden 6 g Ammoniumheptamolybdat-tetrahydrat und 0,1454 g Kaliumantimon(III)oxidentartrat-hemihydrat in 266 mL 10 M Schwefelsäure gelöst und mit dest. Wasser auf 1 L aufgefüllt. Zur Aktivierung der Lösung wurden 0,528 g Ascorbinsäure in 100 mL Anfärbereagenz gelöst. Für die Anfärbung wurden 8 mL aktiviertes Anfärbereagenz mit 20 mL dest. Wasser in einem 50 mL Messkolben vermischt. Ein Äquivalent des CAL-Extrakts wurde hinzugegeben, welches bei Hähnchenkot und Gärrestproben bei etwa 0,5 mL liegt,

bei Proben mit geringerem Phosphorgehalt wie Mais oder Zuckerrübe bei bis zu 5 mL, anschließend wurde mit dest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Probe wurde nach 30 min bei der Wellenlänge 772 nm mit einem Perkin Elmer Lambda 35 UV/VIS Spektrometer gemessen. Die Konzentrationen der verwendeten Kalibriergerade waren 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 mg/L P.

2.2.5 Gesamtphosphorgehalt (Königswasseraufschluss) (VDLUFA, 2000a)

Der Gesamtphosphorgehalt wurde mittels Königswasseraufschluss bestimmt, für den 1 g getrocknetes, gemahlenes Probenmaterial in einen 100 mL Rundkolben eingewogen und mit 25 mL Königswasser (HCl:HNO₃, 3:1, v:v) versetzt wurde. Die Mischung wurde über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag für 2 h unter Rückfluss gekocht. Der Extrakt wurde in einen 100 mL Messkolben überführt, mit dest. Wasser aufgefüllt und anschließend durch einen Sartorius 292 Filter filtriert. Das Filtrat wurde bis zur Messung bei 4 °C gelagert und mit einem Thermo scientific iCAP 6000 series ICP-OES-Spektrometer gemessen.

2.3 Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Antibiotikarückständen in Wirtschaftsdüngern, Klärschlämmen und Gärresten der Biovergasung

2.3.1 Extraktion der Antibiotika

Die Methode zur Extraktion der Antibiotika basiert auf der von Jacobson (2006), welche für die Extraktion von Tetracyclinen, Sulfonamiden und Tylosin optimiert wurde. In der vorliegenden Arbeit sollten aus der Gruppe der Tetracycline das Tetracyclin (TC), Oxytetracyclin (OTC) und Chlortetracyclin (CTC) untersucht werden, aus der Gruppe der Sulfonamide das Sulfadiazin (SD) und das Sulfamethazin (SM) und zusätzlich aus der Gruppe der Fluorchinolone das Enrofloxacin (EN), Ciprofloxacin (CP) und Difloxacin (DF). Dies machte einige Anpassungen der Methode notwendig. Die Wiederfindungsraten der Fluorchinolone

lagen anfangs nur zwischen 5 – 9 %, weswegen besonders auf die Steigerung dieser Extraktionsraten Wert gelegt wurde. Die Optimierung der Methode wurde anhand eines Gärrests durchgeführt, welcher ausschließlich aus pflanzlichem Material ohne Gülleeinsatz hergestellt wurde und somit frei von Antibiotika war. Vor der Extraktion wurden die zu analysierenden Antibiotika zugesetzt, um anschließend die Wiederfindungsraten zu bestimmen. Es ist bekannt, dass Tetracycline Chelatkomplexe mit Metallionen bilden und an Proteine sowie Silanolgruppen binden (Hamscher et al., 2002). Daher wurden die Glasgeräte wie von Hamscher et al. (2002) vorgeschlagen, mit gesättigter, methanolischer Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (EDTA) gespült und luftgetrocknet. Auf das Ausheizen der Glasgeräte bei 450 °C in der von Hamscher beschriebenen Methode wurde jedoch verzichtet, da die Glasgeräte möglichst schnell wieder einsatzbereit sein sollten.

In der Methode von Jacobson (2006) wird die Extraktion von gefriergetrocknetem, gemahlenem Probenmaterial durch eine beschleunigte Lösungsmittlextraktion (pressurised liquid extraction) beschrieben, für welche jedoch kein Gerät zur Verfügung stand. Stattdessen wurden die Extraktionsschritte in 50 mL Kunststoff-Zentrifugenröhrchen durchgeführt, welche nach Einwiegen der Probe und Zugeben des Extraktionsmittels zunächst kurz gevortext und anschließend 20 min in einem Ultraschallbad extrahiert wurden. Eine kürzere Extraktionszeit von 10 min zeigte eine Verringerung der Extraktionsraten bei Tetracyclinen um etwa 10 %, bei Fluorchinolonen um 2 %, während die Extraktionsraten der Sulfonamide konstant blieben. Aus diesem Grund wurde die Extraktionszeit bei 20 min belassen.

Der Methode nach Jacobson (2006) liegt eine Extraktion mit einem Citronensäure-Phosphat-Puffer zugrunde. Im Verlauf der Arbeit sollte getestet werden, ob ein Citronensäure-Phosphat-Puffer welcher EDTA enthält bessere Extraktionsraten ermöglicht. Nach einigen Versuche zeigte sich, dass ein 0,2 molarer Citratpuffer mit pH 3,7 und 9,3 g/L Dinatrium-EDTA je nach Antibiotikum 2 – 10 % bessere Wiederfindungsraten erbrachte als der von Jacobson verwendete Puffer. Während der Arbeit wurde festgestellt, dass Fluorchinolone gut in angesäuertem Methanol löslich sind, weswegen ein vierter Extraktionsschritt mit Methanol + 1 % Ameisensäure nach den drei vorangegangenen Extraktionen eingeführt wurde. Da das Methanol vor der anschließenden SPE-Aufarbeitung (solid phase extraction, Festphasenextraktion) wieder entfernt werden musste, der Vacuumkonzentrator

dafür jedoch sehr viel Zeit benötigte, wurde das Volumen der methanolischen Extraktionsschritte von zuvor 20 mL auf je 10 mL reduziert. Durch das Aufteilen und die Modifikation der methanolischen Extraktionsschritte konnte die Wiederfindung der Fluorchinolone um ca. 5 % und die der Tetracycline um 10 % gesteigert werden.

Bei der SPE-Aufarbeitung nach Jacobson (2006) wurden zwei verschiedene SPE-Kartuschen, eine mit einem starken Anionenaustauscher- und eine mit Umkehrphasenmaterial verwendet. Die Kartusche mit dem Anionenaustauscher soll Verunreinigungen wie Huminsäuren eliminieren, verstopfte bei den Gärrest-Extrakten jedoch häufig. Des Weiteren lieferten Extrakte, bei denen keine Anionenaustauscher-Kartusche verwendet wurde, kein schlechteres Messergebnis. Aus Gründen der Zeit- und Kostenersparnis wurde daher nur noch die SPE-Kartusche mit dem Umkehrphasenmaterial verwendet. Eine weitere Veränderung der SPE-Aufarbeitung bestand in der Elution der Proben von der SPE-Kartusche. Die in der ursprünglichen Methode beschriebenen 2 mL Methanol reichten nicht aus, um sämtliche Antibiotika von dem Phasenmaterial zu lösen. Zudem zeigte sich, dass pures Methanol Fluorchinolone nur teilweise von der SPE-Kartusche eluierte. Als Konsequenz wurde die Elution mit 4 mL Methanol gefolgt von 4 mL Methanol + 1 % Ameisensäure durchgeführt. Die Elution mit Acetonitril durchzuführen, welches in vielen Fällen eine höhere Elutionskraft besitzt, brachte keine weitere Verbesserung und hätte wegen des höheren Siedepunkts eine längere Konzentration im Vacuumkonzentrator zur Folge gehabt.

Zur Optimierung der Wiederfindungsraten wurde wie bereits erwähnt ein Gärrest verwendet, welcher aus der Vergärung von pflanzlichem Material ohne Zugabe von Gülle oder Mist hergestellt wurde. Zusätzlich wurden die Wiederfindungsraten für einen nicht kontaminierten Hähnchenkot bestimmt, da sich in Abhängigkeit vom Substrat ganz unterschiedliche Wiederfindungsraten ergaben. Die Wiederfindungsraten im Gärrest und Hähnchenkot wurden für jeweils zwei verschiedene Antibiotikakonzentrationen ermittelt (Tabelle 3). Da in der vorliegenden Arbeit viele verschiedene Probenmaterialien mit unterschiedlichen Matrices untersucht wurden, wurden vor der Extraktion interne Standards zugesetzt, um die Extraktionsraten beurteilen zu können. Für die Klasse der Fluorchinolone wurden Norfloxacin (NF) und Ofloxacin (OF), für die Tetracycline Methacyclin (MTC) und Demeclocyclin (DMC) und für die Sulfonamide Sulfamethoxazol (SMZ) als interne

Standards eingesetzt. Die Wiederfindungsraten der internen Standards variieren je nach Probenmatrix sehr stark und können deutlich von den tabellarisch aufgeführten Wiederfindungsraten abweichen, weshalb die Endergebnisse im Ergebnisteil nicht mit den Wiederfindungsraten der internen Standards korrigiert wurden.

Tabelle 3: Prozentuale Wiederfindungsraten der Antibiotika und internen Standards bei verschiedenen Konzentrationen in einem gespikten Gärrest und Hähnchenkot (WF: Wiederfindungsrate [%], SD: Standardabweichung)

	Gärrest				Hähnchenkot			
	Zugesetzte Antibiotikakonzentration							
	9333 µg/kg		666 µg/kg		9333 µg/kg		666 µg/kg	
	WF	SD	WF	SD	WF	SD	WF	SD
Sulfadiazin	74,3	4,7	93,3	11,3	60,2	3,4	70,6	1,2
Sulfamethazin	79,5	7,6	80,4	8,2	63,1	4,0	67,1	3,2
Ciprofloxacin	28,5	5,0	26,0	2,7	38,9	1,9	41,0	8,6
Enrofloxacin	26,2	7,5	50,3	10,7	44,8	2,4	60,1	5,7
Difloxacin	20,9	5,3	19,8	4,9	45,3	4,9	48,3	9,8
Tetracyclin	50,6	7,3	60,3	8,8	56,9	0,9	56,9	13,7
Oxytetracyclin	61,8	13,7	58,2	5,8	62,1	11,7	62,1	10,1
Chlortetracyclin	37,1	5,2	33,6	4,3	47,1	0,9	47,1	11,4
Sulfamethoxazol	75,6	12,3	79,2	2,7	67,0	4,0	67,0	5,0
Norfloxacin	33,2	6,1	40,3	6,4	41,2	2,8	41,2	0,7
Methacyclin	33,4	4,3	30,2	3,2	46,2	1,8	46,2	9,4
Ofloxacin	38,5	7,5	56,9	4,6	54,7	2,8	54,7	11,3
Demeclocyclin	36,7	6,1	35,2	4,4	49,7	1,4	49,7	6,7

2.3.2 LC-MS Methode zur Quantifizierung von Antibiotika in Probenextrakten

Für die Quantifizierung der Antibiotika sollte eine Methode entwickelt werden, welche möglichst viele Zielsubstanzen gleichzeitig in geringer Konzentration erfassen kann. Zunächst wurde im Enhanced-MS-Modus (EMS) gemessen, welcher es erlaubt einen großen Masse-zu-Ladungs-Bereich unspezifisch auf verschiedene Antibiotika zu scannen. Es zeigte sich jedoch, dass die Empfindlichkeit dieses Modus nicht ausreicht, um Spurenanalytik in Gärrestextrakten durchzuführen. Abbildung 3 zeigt

einen mit Tetracyclin gespikten Gärrestextrakt welcher im EMS- (links) und MRM-Modus (rechts) gemessen wurde. Während im EMS-Modus die Tetracyclin-Signale im Grundrauschen nicht sichtbar sind, sind diese im MRM-Modus (Multiple Reaction Monitoring) klar erkennbar. Im MRM-Modus werden nur Massenübergänge gemessen, welche spezifisch auf Analyten ausgerichtet sind. Da nur die relevanten Massenübergänge betrachtet werden, minimiert sich das Grundrauschen deutlich und die Sensitivität steigt an. Der Nachteil des MRM-Modus ist, dass nur in der Methode kalibrierte Antibiotika nachgewiesen werden können, ein unspezifisches Screening einer Probe auf sämtliche Antibiotika ist somit nicht möglich. Da mit jedem weiteren Antibiotikum der Messzyklus länger wird und die Sensitivität somit abnimmt, wurde die finale Methode auf acht Antibiotika aus drei verschiedenen Klassen beschränkt.

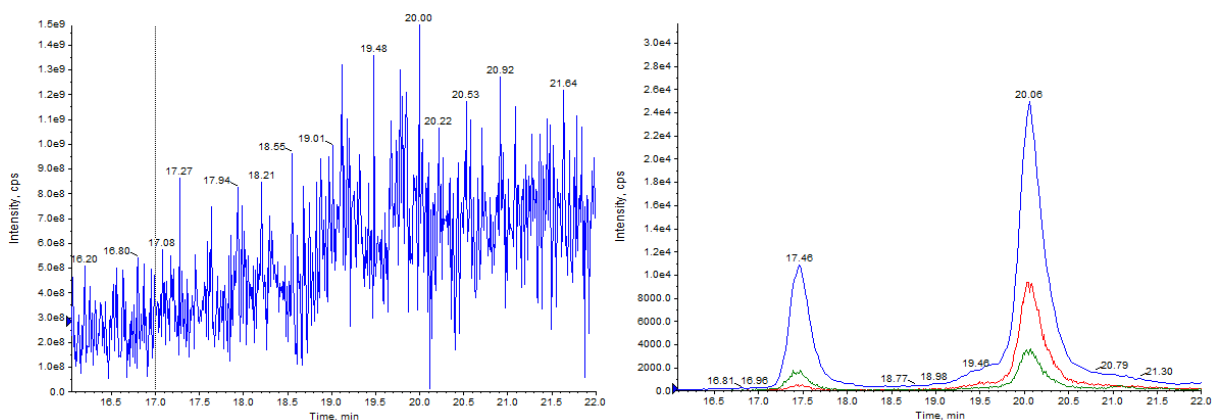


Abbildung 3: Chromatogramme eines mit Tetracyclin gespikten Gärrest-Extrakts, links im EMS-Modus (240 – 500 m/z), rechts im MRM-Modus: Epi-Tetracyclin und Tetracyclin (445/410, 445/427, 445/154 m/z)

In Abbildung 4 ist das Chromatogramm eines vor der Extraktion gespikten Gärrests dargestellt, die Retentionszeiten der Analyten finden sich in Tabelle 4. Aufgrund der Vielzahl der Substanzen war es nicht möglich die Methode so anzupassen, dass alle Peaks vollständig getrennt sind. Dies ist jedoch nicht zwingend notwendig, da im MRM-Modus gemessen wurde, welcher trotz zeitlicher Überlagerung der Peaks eine getrennte Ansicht und sichere Zuordnung anhand der Massenübergänge erlaubt. Das für die Trennung der Analyten verwendete Fließmittelsystem bestand aus Wasser mit 77,08 mg/L Ammoniumacetat und 0,1 % Ameisensäure (A) und Methanol

mit 0,1 % Ameisensäure (B), der Gradient der Methode ist Tabelle 5 zu entnehmen. Die Tetracycline wiesen jeweils zwei Peaks auf, wobei der zweite Peak auf die Epimer-Form (Epi) entfiel, welche etwas früher als die Ursprungssubstanz eluierte. Die Peaks von CTC und MTC waren sehr breit und weniger scharf als die anderen Peaks. Versuche die Schärfe dieser Peaks zu verbessern, indem der Gradient verändert wurde und statt Methanol Acetonitril als Fließmittel eingesetzt wurde, welches eine höhere Elutionskraft aufweist, blieben erfolglos. Stattdessen wurde die Trennung der einzelnen Substanzen verschlechtert, welche sich durch die Modifikationen mehr überlagerten.

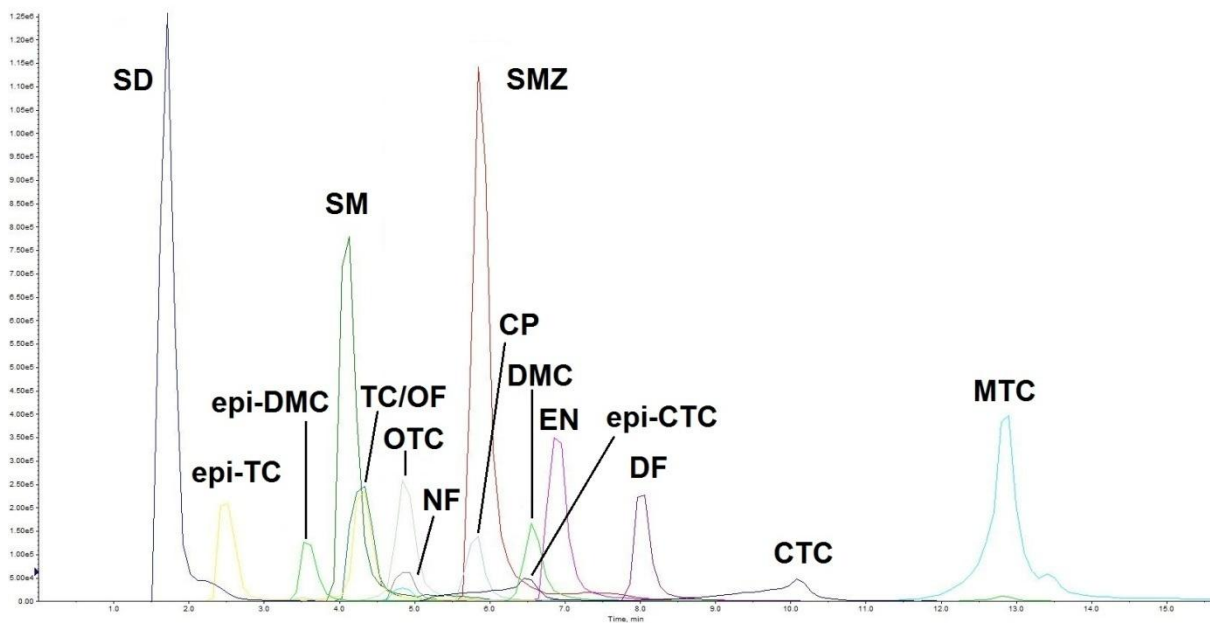


Abbildung 4: Chromatogramm eines gespikten Gärrests (SD: Sulfadiazin, SM: Sulfamethazin, SMZ: Sulfamethoxazol, DMC: Demeclocyclin, TC: Tetracyclin, OTC: Oxytetracyclin, CTC: Chlortetracyclin, MTC: Methacyclin, CP: Ciprofloxacin, DF: Difloxacin, EN: Enrofloxacin, NF: Norfloxacin, OF: Ofloxacin)

Tabelle 4: Retentionszeiten der Analyten und internen Standards (inklusive ihrer Epimere)

Analyt	Retentionszeit [min]	Analyt	Retentionszeit [min]
Chlortetracyclin	9,84	Methacyclin	12,65
Ciprofloxacin	5,61	Norfloxacin	4,69
Demeclocyclin	6,37	Ofloxacin	4,14
Difloxacin	7,80	Oxytetracyclin	4,69
Enrofloxacin	6,67	Sulfadiazin	1,69
Epi-Chlortetracyclin	6,37	Sulfamethazin	4,02
Epi-Demeclocyclin	3,49	Sulfamethoxazol	5,75
Epi-Oxytetracyclin	3,41	Tetracyclin	4,15
Epi-Tetracyclin	2,46		

Tabelle 5: LC-Gradient für die Bestimmung von Antibiotika in Probenextrakten; (Fließmittel A: Wasser + 77,08 mg/L Ammoniumacetat + 0,1 % Ameisensäure (MS-Grade); Fließmittel B: Methanol (LC-MS Grade) + 0,1 % Ameisensäure)

Zeit [min]	A [%]
0	83
13	65
16	8
20	8
21	83
29	83

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD), bei der ein Stoff als sicher nachgewiesen gilt, wurde über ein Signal-to-Noise-Level (S:N) ≥ 3 definiert und die Bestimmungsgrenze, über der quantifiziert werden kann bei S:N ≥ 10 . Da die Matrices der Proben und ihr Untergrundrauschen in der Messung sehr unterschiedlich ausfielen, wurde das Signal-to-Noise-Verhältnis jeder Messung einzeln bestimmt, hieraus resultieren die Bestimmungsgrenzen aus Tabelle 6. Die untere Grenze zeigt die kleinsten quantifizierbaren Werte (S:N ≥ 10), während die obere Grenze durch die größten Messwerte gekennzeichnet ist, welche ein S:N ≤ 10 aufweisen und die Bestimmungsgrenze somit nicht erreichen. Der Vergleich zeigt, dass sich die Bestimmungsgrenze zwischen zwei verschiedenen Proben um das 10-fache unterscheiden kann. Das Signal-to-Noise-Verhältnis wurde durch das Signal-to-Noise-Tool der Software „Analyst“ Version 1.6.2 berechnet.

Tabelle 6: Überblick über die unteren Bestimmungsgrenzen verschiedener Probenextrakte der Antibiotikaanalytik

Analyt	Bestimmungsgrenzen [$\mu\text{g}/\text{kg TM}$]
Sulfadiazin	3,5 – 32,9
Sulfamethazin	6,2 – 21,3
Ciprofloxacin	22,4 – 216
Enrofloxacin	8,6 – 150
Difloxacin	*
Tetracyclin	13,0 – 78,5
Oxytetracyclin	28,0 – 31,1
Chlortetracyclin	218 – 231

*DF wurde in den Proben nicht detektiert

Zur Quantifizierung wurde das Standardadditionsverfahren gewählt, bei dem Aliquote des Probenextrakts mit verschiedenen Konzentrationen der Analyten versetzt werden. Da die Standards direkt mit der Probenmatrix vermischt werden, werden Matrixeinflüsse minimiert, dies ist besonders bei der Vielzahl an verschiedenen Proben wichtig. Da Tetracycline in Lösung epimerisieren (Hamscher et al., 2002), wurden die einzelnen Tetracycline als Summe der Epi- und ihrer Ursprungsform quantifiziert.

2.3.3 Zusammenfassung der optimierten Methode zur Bestimmung von Antibiotikarückständen in Gärresten und Substraten der Biovergasung

Für die Extraktion der Antibiotika wurden zunächst alle für die Extraktion benötigten Glasgeräte mit gesättigter methanolischer EDTA-Lösung gespült, um ein Anhaften der Tetracycline am Glas zu verhindern. Es wurden 0,75 g gefriergetrocknete, gemahlene Probe in ein 50 mL Kunststoff-Zentrifugenröhrchen (Falcon-Tube) eingewogen und 50 μL des internen Standard-Mixes (je 10.000 $\mu\text{g}/\text{L}$ Sulfamethoxazol, Norfloxacin, Ofloxacin, Methacyclin und Demeclocyclin (Vetranal, Sigma Aldrich) in Methanol) zugegeben. Für den ersten Extraktionsschritt wurden 20 mL der Extraktionslösung 1 (23,137 g Citronensäure-monohydrat (Ph. Eur. Merck), 15,263 g Natriumcitrat-dihydrat (98 %, Sigma Aldrich) und 9,3 g Dinatrium-EDTA (Biochemia, Applichem)) hinzu pipettiert und für 10 Sekunden gevortext.

Anschließend wurde das Gemisch für 20 min in einem Ultraschallbad extrahiert, bei 10.000 g 10 min zentrifugiert und der Überstand in einen 100 mL Erlenmeyerkolben überführt. Der erste Extraktionsschritt wurde wiederholt und die Extrakte im Erlenmeyerkolben vereinigt. Die dritte Extraktion erfolgte mit 10 mL der Extraktionslösung 2 (4,203 g Citronensäure-monohydrat in 100 mL dest. Wasser gelöst, anschließend mit Methanol auf 500 mL aufgefüllt), dessen Überstand nach Vortexen, 20 min Ultraschallbad und Zentrifugation (10.000 g, 10 min) in ein weiteres 50 mL Kunststoff-Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Die vierte Extraktion erfolgte mit 10 mL Methanol angesäuert mit 1 % Ameisensäure, nach dem Vortexen wurde die Mischung über Nacht stehen gelassen. Nach Zentrifugation (10.000 g, 10 min) wurde der Überstand mit dem der dritten Extraktion vereinigt und im Eppendorf Concentrator (Programm: vacuum-aqueous) auf etwa 5 mL eingengt. Die eingengten Extrakte wurden mit den Lösungen der ersten beiden Extraktionsschritte vereinigt und einer flüssig-flüssig Extraktion mit 10 mL Heptan (p.a., Sigma Aldrich) unterzogen. Der entfettete Extrakt wurde mit dest. Wasser auf 100 mL aufgefüllt, der pH-Wert mit Ameisensäure auf pH 3 eingestellt und anschließend durch einen Rundfilter (Macherey-Nagel 85/90 BF) vakuumfiltriert. Für die folgende Solid-Phase-Extraction (SPE) wurden die SPE-Kartuschen (Phenomenex Strata-X 33u Polymeric reversed Phase, 200 mg/ 6mL) mit 3 mL Methanol und 3 mL Citronensäurepuffer pH 3 (0,574 g Citronensäure-monohydrat + 0,176 g Citrat-dihydrat mit dest. Wasser auf 100 mL aufgefüllt) konditioniert. Der Probenextrakt wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von etwa 5 mL/min über die Kartuschen geleitet, welche anschließend mit 8 mL dest. Wasser gewaschen und 15 min unter Vakuum getrocknet wurden. Die an die SPE-Kartusche gebundenen Antibiotika wurden mit 4 mL Methanol und 4 mL Methanol+1 % Ameisensäure in ein 15 mL Kunststoff-Zentrifugenröhrchen (Falcon-Tube) eluiert und der Extrakt am Eppendorf Concentrator auf etwa 1 mL eingengt. Der Extrakt wurde quantitativ in einen 2 mL Messkolben überführt, mit Methanol aufgefüllt und durch einen Spritzenvorsatzfilter (Wicom Perfect Flow, PPVDF, 13 mm, 0,2 µm) in ein HPLC-Vial filtriert.

Zur Quantifizierung wurde eine Standardaddition durchgeführt indem je 50 µL Probenextrakt mit 50 µL Standardlösung (Konzentrationen 100 – 2500 µg/L) in einem HPLC-Vial mit Microeinsatz gemischt wurden. Die Analyse erfolgte an einer Agilent 1200 HPLC-Anlage und einer Phenomenex Kinetex 2,6 u XB-C 18 100 A Trennsäule (100 x 2,1 mm), gekoppelt mit einem AB Sciex 4000 Qtrap LC/MS/MS-System mit

Electrospray-Ionisierung (ESI). Das Injektionsvolumen betrug 2 µL, der Säulenofen wurde auf 40 °C temperiert. Als Fließmittel A wurde Wasser mit 0,0771 g/L Ammoniumacetat (p.a., Applichem) + 0,1 % Ameisensäure (MS-Grade) verwendet, als Fließmittel B Methanol (LC-MS Grade, Applichem) + 0,1 % Ameisensäure (MS-Grade). Der verwendete Gradient findet sich in Tabelle 5 in Kapitel 2.3.2. Eine Tabelle mit den Ionisierungsparametern der einzelnen Analyten findet sich in Tabelle A 2 im Anhang.

2.4 Kombinationstoxikologie von Antibiotika und Schwermetallen

In Modellversuchen sollte untersucht werden, ob Antibiotikarückstände in Kombination mit Schwermetallen eine veränderte Toxizität für Wasserorganismen und Pflanzen aufweisen. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden kommerziell verfügbare Toxkits verwendet, sowie ein Hydrokultur- und Gefäßversuch mit Senf (*Sinapis alba*) durchgeführt.

2.4.1 Toxkits

Daphnia magna Toxizitätsuntersuchung

Um die Toxizität einzelner Stoffe auf bestimmte Organismen nachzuweisen, wurden kommerziell verfügbare Toxkits verwendet. Zunächst wurden Daphnien-Toxkits eingesetzt, um die Folgen der Auswaschung von Schadstoffen, insbesondere Antibiotika, auf eine aquatische Umgebung abzuschätzen. Bei *Daphnia magna* (Abbildung 5) handelt es sich um den Großen Wasserfloh, welcher in Süßwasser heimisch ist und bis zu 5 mm groß wird (Schanz, 2006). Er wird häufig für ökotoxikologische Tests herangezogen, da er empfindlich auf Schadstoffe reagiert (Anonymous, 2012a).



Abbildung 5: *Daphnia magna* unter dem Mikroskop

Für die Daphnien-Toxizitätstests wurde das „Daphtoxkit F™“ der Firma Microbiotest Inc. (Belgien) verwendet, in dem alle benötigten Materialien für den Test enthalten waren. Die Tests wurden wie in der Anleitung beschrieben durchgeführt. Die Daphnien-Ephippien (Wasserfloh-Dauereier) wurden aus dem Kunststoffröhrchen in ein Mikrosieb überführt und mit Leitungswasser gespült, um Rückstände der Aufbewahrungslösung zu entfernen. Es wurde eine standardisierte Frischwasserlösung aus den beigefügten Ampullen und destilliertem Wasser nach Anleitung hergestellt. Die Ephippien wurden in eine mit Standard-Frischwasser gefüllte Petrischale überführt, bei 20 °C temperiert und bei einer konstanten Beleuchtung von 6000 lux 72 h bis zum Schlüpfen inkubiert. Vor Beginn des Tests wurden die Daphnien mit dem mitgeliefertem Spirulina-Algenpulver gefüttert und nach 2 h in die Testlösungen eingesetzt.

Zum Ansetzen des Tests wurde die Frischwasserlösung mit verschiedenen Konzentrationen der zu testenden, toxischen Stoffe versetzt. Es wurden die toxischen Einflüsse der drei Antibiotika Sulfadiazin, Enrofloxacin und Tetracyclin sowie der Schwermetalle Kupfer, Zink und Eisen getestet (Tabelle 7). Die Schwermetalle wurden als Chloride zugesetzt, die Konzentrationen beziehen sich jeweils auf den Schwermetallgehalt. Die zu testende Substanz wurde eingewogen und in einem 100 mL Messkolben mit Standard-Frischwasserlösung aufgefüllt. Die

vier Verdünnungen dieser Stammlösung wurden ebenfalls mit Standard-Frischwasserlösung aufgefüllt.

Für das Befüllen der Testplatte (Abbildung 6) wurden je 20 mL Lösung in die Vertiefungen gefüllt, wobei die horizontale Reihe „X“ der Kontrolle entspricht, in der nur Standard-Frischwasserlösung enthalten war. In die Reihen 1 – 5 wurden die Verdünnungen des zu testenden Stoffs in aufsteigender Konzentration eingefüllt. Die etwas abgesetzten Vertiefungen an der linken Seite dienen lediglich dem Transfer der Daphnien, in diese wurden je mindestens 20 Daphnien per Kunststoffpipette eingesetzt. Aus dieser Vertiefung wurden je 5 Daphnien in die rechts daneben liegende Reihe eingesetzt, um eine zu starke Verdünnung durch direktes Einsetzen in die Testfelder zu vermeiden. Die Transfervertiefungen wurden bei der Auszählung des Tests nicht berücksichtigt, es handelte sich um eine Vierfachbestimmung.

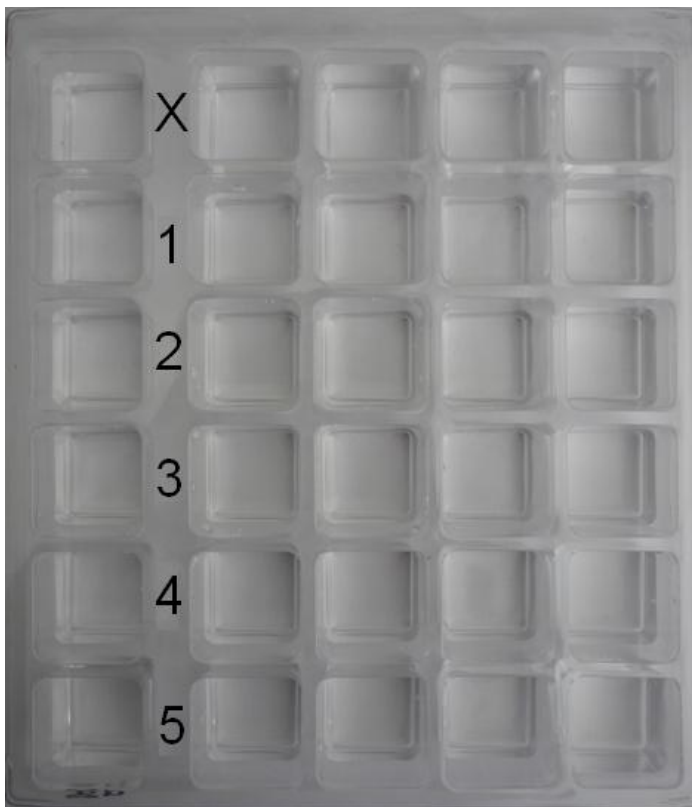


Abbildung 6: Testplatte des Daphtoxkit F™; linke Reihe Transfervertiefungen, rechts je vier Vertiefungen für Test; X: Reihe für Kontrolle, 1 – 5: Reihen für verschiedene Konzentrationen der Testsubstanz

Beim Einsetzen der Daphnien war zu beachten, dass nur vitale Individuen verwendet werden, um den Test nicht zu verfälschen. Nach je 24 und 48 h wurde bestimmt wie

viele der Daphnien einen Effekt aufweisen. Als Effekt wurde die Immobilisierung der Daphnien festgelegt, das heißt ein aktives Schwimmen ist auch nach kurzem Anstoßen des Gefäßes nicht zu beobachten. Der Effekt der Immobilisierung wurde verwendet, da dieser schon bei geringen Konzentrationen auftritt und auch deutlich geschädigte Individuen mit einbezogen werden. Des Weiteren ist eine Unterscheidung zwischen immobilen und toten Individuen häufig schwer. Aus den Ergebnissen der Zählung wurde mit dem mitgelieferten Excel-Programm die 50 %-Effektkonzentration (EC_{50}), also jene Konzentration bei der 50 % der Individuen bewegungsunfähig sind, berechnet.

Tabelle 7: Getestete Konzentrationen der Substanzen bei den Daphtoxkit FTM

Enrofloxacin [mg/L]	Sulfadiazin [mg/L]	Tetracyclin [mg/L]	Kupfer [mg/L]	Zink [mg/L]	Eisen [mg/L]
193,2	500	220	4,35	18,0	38,0
58,0	280	22,0	1,39	10,1	21,3
19,3	160	2,04	0,44	5,76	12,2
6,18	90,0	0,20	0,14	3,24	6,84
1,93	50,0	0,02	0,04	1,80	3,80

Phytotoxizitätsuntersuchung

Neben der Toxizität auf Daphnien wurden auch Phytotoxizitätstests durchgeführt, wofür das „Phytotestkit“ der Firma Microbiotest Inc. (Belgien) verwendet wurde. Prinzipiell bestand das Phytotestkit aus einem Schwamm in einer transparenten Kunststoffhülle (Abbildung 7), welcher mit je 20 mL der zu testenden Lösung befeuchtet und mit einem schwarzen Filterpapier abgedeckt wurde. Auf das Filterpapier wurden 10 Samen von *Sinapis alba* gelegt und die transparente Hülle verschlossen. Anschließend wurde der Toxtest bei 20 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Nach 3 und 5 Tagen wurden die Testplatten fotografiert und die Wurzellänge auf dem Foto mit der Freeware Software Inkscape bestimmt. In der Software wurde der Pfad der Wurzel nachgezeichnet, woraufhin die Länge des gezeichneten Pfades in Pixeln bestimmt wurde. Aus einer Referenzlänge auf dem Foto (Höhe des Filterpapiers) kann die Länge der Wurzel in Zentimetern berechnet werden.

Um sicherzustellen, dass sich der pH-Wert der Testlösung durch das Lösen des Analyten nicht verändert, wurden die Analyten in einem Citronensäure-Citrat-Puffer mit pH 6 gelöst (0,477 g/L Natriumcitrat-dihydrat, 0,023 g/L Citronensäuremonohydrat). Der pH-Wert wurde leicht sauer gewählt, da Enrofloxacin schwer im Neutralen löslich ist. Nach dem Lösen wurde der pH-Wert erneut kontrolliert und gegebenenfalls mit NaOH oder HCl auf pH 6 justiert. Es befanden sich sonst keine Nährstoffe in der Testlösung. Bei jeder Durchführung des Versuchs wurde eine Kontrolle angesetzt, bei der der Schwamm nur mit dem verwendeten Citronensäure-Citrat-Puffer getränkt wurde.

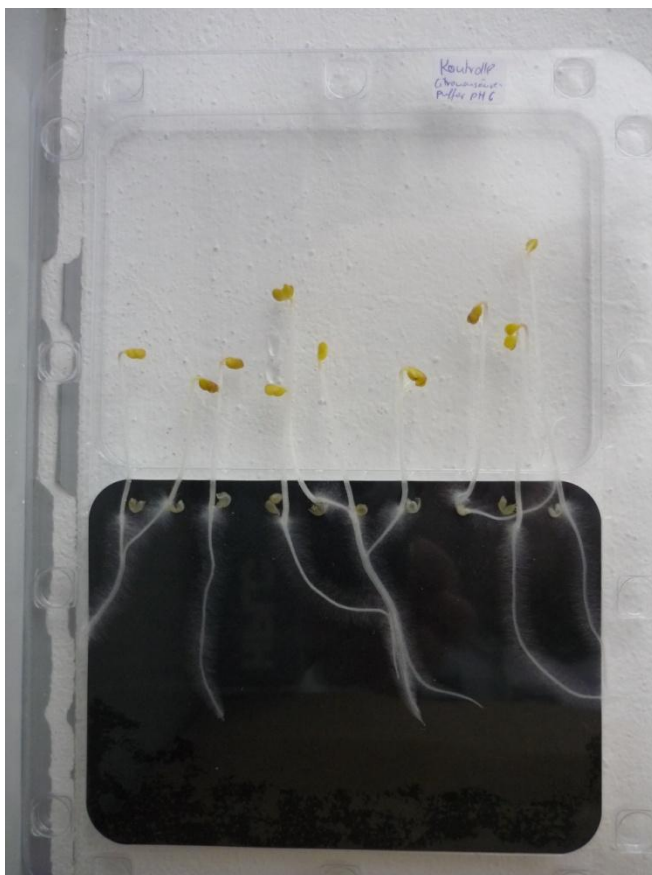


Abbildung 7: Phytotestkit mit *Sinapis alba*, Kontrolle in Citronensäurepuffer (pH 6) nach 5 Tagen

Stellvertretend für die drei verschiedenen Antibiotikaklassen der Fluorchinolone, Sulfonamide und Tetracycline wurden die Substanzen Enrofloxacin, Sulfadiazin und Tetracyclin getestet. Als Vertreter der Schwermetalle wurde die Toxizität von Kupfer untersucht. Die getesteten Konzentrationen der einzelnen Substanzen finden sich in Tabelle 8.

Tabelle 8: Getestete Konzentrationen der Substanzen bei den Phytotestkits mit *Sinapis alba*

Enrofloxacin [mg/L]	Sulfadiazin [mg/L]	Tetracyclin [mg/L]	Kupfer [mg/L]
300	150	300	24,0
150	75,0	150	12,0
75,0	37,5	75,0	6,0
37,5	18,8	37,5	4,0
18,8	9,4	18,8	2,0
	4,7		1,0
	2,4		0,5

Für die Untersuchung der kombinatorischen Wirkung von mehreren Antibiotika auf *Sinapis alba* wurde eine der zu untersuchenden Substanzen (A) in einer konstanten Konzentration zugesetzt, während die andere Substanz (B) wie bei den vorangegangenen Tests in einer variablen Konzentration vorlag (Tabelle 9). Der Test wurde gleichermaßen für Substanz B in konstanter und Substanz A in variabler Konzentration durchgeführt.

Tabelle 9: Verwendete Konzentrationen von Antibiotika und Kupfer bei den Kombinationsversuchen in Phytotestkits mit *Sinapis alba*

Enrofloxacin konstant (150 mg/L)			Sulfadiazin konstant (3 mg/L)		Tetracyclin konstant (30 mg/L)	
Kupfer [mg/L]	Sulfadiazin [mg/L]	Tetracyclin [mg/L]	Enrofloxacin [mg/L]	Tetracyclin [mg/L]	Enrofloxacin [mg/L]	Sulfadiazin [mg/L]
50,0	150	300	300	300	300	75,0
25,0	75,0	150	150	150	150	37,5
12,5	37,5	75,0	75,0	75,0	75,0	18,8
6,25	18,8	37,5	37,5	37,5	37,5	9,38
3,12	9,38	18,8	18,8	18,8	18,8	4,69
	4,69					2,34
	2,34					

2.4.2 Untersuchung der Toxizität von Enrofloxacin und Kupfer im Hydrokulturversuch

Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den Toxkits auf einen Gefäßversuch zu überprüfen, wurde ein Hydrokulturversuch angelegt. Dieser erlaubt eine längere Laufzeit, da in diesem Test Nährstoffe in Lösung vorliegen, ein Lichtzyklus angewendet wird und keine Begrenzung des Wachstums durch eine Kunststoffhülle vorliegt.

Für den Hydrokulturversuch wurde eine Hoagland-Lösung verwendet, welche aus fünf verschiedenen Stammlösungen besteht (Tabelle 10). Für 10 L Hoagland-Lösung wurden je 50 mL der Stammlösung I, II und III, 5 mL der Stammlösung IV und 40 mL der Stammlösung V gemischt und mit dest. Wasser auf 10 L aufgefüllt. Anschließend wurde der pH-Wert auf 5,8 eingestellt.

Tabelle 10: Stammlösungen der Hoagland-Lösung welche in der Hydrokultur verwendet wurde

	Konzentration [mM]	Substanz	Konzentration [g/L]
Stammlösung I	500	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	118
Stammlösung II	100	$\text{MgSO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$	22,8
Stammlösung III	500	KNO_3	50,5
	100	KH_2PO_4	13,6
Stammlösung IV	50,0	H_3BO_3	3,09
	4,5	$\text{MgCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,89
	3,8	ZnCl_2	0,52
	0,3	$\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,05
	0,1	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,12
Stammlösung V	10,0	Na-EDTA	3,72
	10,0	$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	2,70

Der Versuch wurde in einer Phytokammer bei einer Temperatur von 28 °C und 10 h/d Helligkeit (6000 lux) durchgeführt. Die Senf-Samen wurden zwischen ein dickes Filterpapier und zwei Schaumstoffschwämme gesteckt, welche in Aussparungen einer schwimmenden Styroporscheibe gedrückt wurden (Abbildung 8). Das Filterpapier stand unter der Styroporscheibe etwas über, damit das

Filterpapier ständig mit Nährlösung getränkt war. Die Gefäße wurden jeweils mit einem Aquariumstein belüftet, welcher an die hauseigene Druckluftversorgung angeschlossen war. Die Druckluftzufuhr der einzelnen Steine konnte mittels Ventilen auf ein einheitliches Niveau eingestellt werden.



Abbildung 8: Aufbau des Hydrokulturversuchs (links), Schwimmplattform für den Hydrokulturversuch (rechts)

Den Gefäßen wurden Kupfer und Enrofloxacin zugesetzt, die Konzentrationen sind Tabelle 11 zu entnehmen. Der Pegelstand in den Gefäßen wurde anfangs markiert um die Verdunstung durch Zugabe von dest. Wasser ausgleichen zu können. Der Versuch hatte eine Laufzeit von 24 Tagen, nach deren Ablauf Fotos der Pflanzen gemacht und die Wurzellänge bestimmt wurde.

Tabelle 11: Enrofloxacin- und Kupferkonzentrationen im Hydrokulturversuch mit *Sinapis alba*

Gefäß Nr.	Enrofloxacin [mg/L]	Kupfer [mg/L]	Gefäß Nr.	Enrofloxacin [mg/L]	Kupfer [mg/L]
1–2	0	0	17–18	0	3
3–4	5	0	19–20	5	3
5–6	25	0	21–22	25	3
7–8	50	0	23–24	50	3
9–10	0	1	25–26	0	6
11–12	5	1	27–28	5	6
13–14	25	1	29–30	25	6
15–16	50	1	31–32	50	6

2.4.3 Anlage eines Gefäßversuchs zur Bestimmung der Toxizität von Enrofloxacin und Kupfer sowie deren Kombination auf die Biomasseentwicklung von *Sinapis alba*

Die in dem vorliegenden Gefäßversuch verwendeten Konzentrationen an Kupfer und Enrofloxacin wurden anhand der Daten der Toxkits und eines Vorversuchs bestimmt. In den Phytotestkits lag die EC₅₀-Konzentration von Enrofloxacin für Wurzelinhibition nach 5 Tagen bei 264,9 mg/L. Da der Gefäßversuch eine längere Laufzeit hatte als die Toxkits und der Effekt somit eventuell stärker ausgefallen wäre, wurde die höchste Konzentration mit 50 mg Enrofloxacin/Gefäß niedriger gewählt als die in den Phytotestkits ermittelte EC₅₀-Konzentration. Zudem wurde im Vorfeld getestet, dass der Sandboden maximal 1 L Wasser aufnehmen kann, sodass ungeachtet der möglichen Adsorption an den Boden, die Konzentration von Enrofloxacin im Bodenwasser 50 mg/L nicht übersteigt.

Da Kupfer in den Phytotestkits kaum einen Effekt auf das Wurzelwachstum gezeigt hatte, vermutlich aufgrund der kurzen Laufzeit des Versuchs, konnten die Konzentrationen im Gefäßversuch nicht auf deren Basis ermittelt werden. Aus diesem Grund wurden zusätzlich Vorversuche in Gefäßen mit *Sinapis alba* durchgeführt, anhand derer die Kupferkonzentration bestimmt werden konnte, bei der ein Effekt auf das Wachstum der Pflanze zu verzeichnen war. Im Vorversuch wurden in Gefäße, welche genauso behandelt wurden wie die im Hauptversuch (siehe unten), Kupferkonzentrationen von 1, 5, 20 und 50 mg/Gefäß und Enrofloxacinkonzentrationen von 5, 25, 50, 100 und 20 mg/Gefäß ausgebracht. Da die Gefäße mit Kupfer bei 5 mg/Gefäß und im Fall des Enrofloxacins bei 50 mg/Gefäß schon eine deutliche Wachstumsreduktion aufwiesen, wurden diese Konzentrationen als Maximalkonzentrationen für den Hauptversuch festgelegt.

Für den Gefäßversuch wurde ein Sandboden aus dem Kieswerk Holcim mit 0 – 3 mm Körnung verwendet. Es wurden je 7 kg Sandboden in ein Mitscherlich-Gefäß gefüllt und der Sandboden mit etwa 10 L dest. Wasser gespült, bis das durchlaufende Wasser möglichst klar war. Dieser Schritt diente dazu, möglichst alle löslichen Nährstoffe zu entfernen, um einheitliche Ausgangsbedingungen zu gewährleisten. Anschließend wurden die Gefäße mit Makro- und Mikronährstoffen gedüngt (Tabelle 12), mit einem großen Spatel umgegraben damit sich die

Nährstoffe besser verteilen und mit 275 mL dest. Wasser gegossen. Für die Zugabe von Kupfer und Enrofloxacin wurden jeweils Stammlösungen in einem Citronensäure-Citrat-Puffer (pH 6, 0,5 g/L, s. Kapitel 2.4.1) angesetzt, von denen 100 mL auf die Gefäße gegeben wurden. Die Konzentrationen sind Tabelle 13 zu entnehmen. Die Gabe von Kupfer erfolgte 6 Tage vor der Aussaat, die von Enrofloxacin 2 Tage davor. Nach der Kupfer- und Enrofloxacin-Gabe wurden je 100 mL dest. Wasser auf die Gefäße gegeben. Pro Gefäß wurden 9 Samen *Sinapis alba* in 0,5 – 1 cm Tiefe ausgesät. Danach wurden die Töpfe randomisiert auf der Gewächshausbahn verteilt.

Tabelle 12: Grunddüngung des Sandgefäßversuchs mit *Sinapis alba*

Element	Konzentration [mg/Gefäß]	Element	Konzentration [mg/Gefäß]
Mg	48,6	Fe	10
Zn	1,0	N	750
Mn	1,0	Ca	100
Cu	0,2	P	155
B	0,5	S	250
Mo	0,1	K	610

Die erste Woche bis zum Auskeimen der Saat blieben die Töpfe mit Frischhaltefolie abgedeckt, um ein zu schnelles Austrocknen des Sandbodens zu verhindern. Danach wurden die Pflanzen täglich nach Bedarf mit dest. Wasser gegossen. Nach 28 Tagen, als die ersten Blütenknospen am Senf aufblühten, erfolgte die Ernte des Versuchs, wobei Blatt-, Stiel- und Wurzelmaterial separat beprobt wurden. Das Blatt- und Stielmaterial wurde sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren, das Wurzelmaterial wurde in den darauf folgenden Tagen aus den Töpfen entfernt, vom Sand befreit, gewaschen und anschließend eingefroren. Die gefrorenen Proben wurden gefriergetrocknet und anschließend mit der Scheibenschwingmühle vermahlen, wofür ein schwermetallfreier Einsatz verwendet wurde. Es wurde die Biomasse ermittelt sowie die Trockenmasse und die Gehalte von Kupfer und Enrofloxacin im Pflanzenmaterial.

Tabelle 13: Kupfer- und Enrofloxacinkonzentrationen im Versuchsaufbau mit *Sinapis alba*

Variante	Gefäß Nr.	Enrofloxacin [mg/Gefäß]	Kupfer [mg/Gefäß]*
1	1–4	0	0
2	5–8	5	0
3	9–12	25	0
4	13–16	50	0
5	17–20	0	1
6	21–24	0	3
7	25–28	0	6
8	29–32	5	1
9	33–36	5	3
10	37–40	5	6
11	41–44	25	1
12	45–48	25	3
13	49–52	25	6
14	53–56	50	1
15	57–60	50	3
16	61–64	50	6

*alle Varianten enthalten zusätzlich eine Grunddüngung von 0,2 mg/Gefäß Cu

Saugkerzenversuch

Parallel zu dem Gefäßversuch wurde ein Experiment mit Saugkerzen durchgeführt. Es wurden Saugkerzen aus PES-Material (Polyethylensulfon) mit einer Porengröße von 0,12 – 0,18 µm und 10 cm Länge (Rhizosphere, Belgien) verwendet, welche die natürliche Wasseraufnahme von Pflanzenwurzeln simulieren sollten.

Die verwendenden Mitscherlich-Gefäße wurden wie im Hauptversuch befüllt, gewaschen und mit einer Grunddüngung versehen. Anschließend wurden die Saugkerzen horizontal in 5 cm Tiefe eingesetzt und wieder mit Sand bedeckt. Die Kupfer- und Enrofloxacin-Gaben wurden ebenso wie im Hauptversuch durchgeführt, die Konzentrationen sind Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 14: Enrofloxacin- und Kupferkonzentrationen in Gefäßen mit Saugkerzen

Gefäß Nr.	Enrofloxacin [mg/Gefäß]	Kupfer [mg/Gefäß]*
65	0	1
66	0	3
67	0	6
68	5	0
69	25	0
70	50	0
Kontrolle	0	0

*alle Varianten enthalten zusätzlich eine Grunddüngung von 0,2 mg/Gefäß Cu

Die Probenahme der Enrofloxacin-Gefäße erfolgte alle 5 Tage, es wurden jeweils 2 mL Bodenwasser entnommen und bei -20 °C in Eppendorf-Caps eingefroren. Vor der Analyse wurden die Proben aufgetaut, durch einen Spritzenvorsatzfilter (Wicom Perfect Flow, PPVDF, 13 mm, 0,2 µm) filtriert, im Eppendorf Concentrator (Programm V-AQ) bis zur Trockne eingedampft und anschließend mit 50 µL Methanol + 1 % Ameisensäure wieder aufgenommen und in ein HPLC-Vial mit Microeinsatz überführt. Die Quantifizierung des Enrofloxacins aus dem Bodenwasser erfolgte mit der LC-MS-Methode, welche in Kapitel 2.3.3 beschrieben ist.

Bei der Probenahme der Kupfer-Gefäße wurden alle 7 Tage 10 mL Bodenwasser entnommen. Die Probe wurde mit 100 µL Salpetersäure (Supra, 69 %ig) versetzt und bei -20 °C bis zur Analyse eingefroren. Die Quantifizierung des Kupfers erfolgte mittels ICP-MS.

Um die Enrofloxacin-Aufnahme der Pflanzen zu bestimmen wurde das gefriergetrocknete und gemahlene Pflanzenmaterial mit der Methode, welche auch für die Analyse der Wirtschaftsdünger genutzt wurde, analysiert (Kapitel 2.3.3). Es wurden ebenfalls 0,75 g Probenmaterial zur Extraktion eingewogen.

Das Kupfer wurde aus dem Pflanzenmaterial extrahiert, indem 0,5 g des gefriergetrockneten und gemahlene Probenmaterials mit 6 mL Salpetersäure (Supra, 69 %ig) in einem Aufschlussgefäß versetzt und 30 min stehen gelassen wurde. Es wurden insgesamt 1,5 mL Wasserstoffperoxid (30 %ig) stufenweise zugesetzt, damit die Probe nicht überschäumte. Die Gefäße wurden verschlossen

und in der Mikrowelle aufgeschlossen, wofür folgendes Programm verwendet wurde: bei 800 W in 5 min auf 120 °C aufheizen und 2 min halten; bei 800 W in 10 min auf 200 °C aufheizen und 15 min halten; bei 400 W in 30 min auf 50°C abkühlen und 5 min halten. Nach dem Abkühlen der Probe wurde der Extrakt in einen 50 mL Messkolben überführt und mit bidest. Wasser aufgefüllt. Nach Durchmischen der Probe wurde der Extrakt durch einen Faltenfilter (Sartorius Typ 292) in eine PE-Flasche filtriert und der Kupfergehalt mittels ICP-MS bestimmt.

Um zu ermitteln, welche Menge an Enrofloxacin in den verschiedenen Bodenhorizonten gebunden ist, wurde der Sandboden aus den Saugkerzengefäßen extrahiert. Zunächst wurde die Saugkerze vorsichtig aus den Töpfen entnommen, ohne den Boden unnötig zu vermischen. Danach wurde ein Bohrstock in den Boden getrieben und mitsamt dem Boden entnommen. Der 12 cm lange Kern wurde in jeweils 4 cm hohe Abschnitte unterteilt. Zusätzlich wurden Bodenproben von der Oberfläche mithilfe eines Löffels abgenommen. Die Bodenproben wurden im Trockenschrank bei 45 °C über Nacht getrocknet. Es wurden jeweils 15 g Sand in einen 100 mL Erlenmeyerkolben eingewogen, mit 40 mL Extraktionslösung (Methanol + 1 % Ameisensäure) vermischt und 20 min im Ultraschallbad unter gelegentlichem Umschwenken extrahiert. Der Überstand wurde durch einen Faltenfilter in ein 50 mL Kunststoff-Zentrifugenröhrchen (Falcon-Tube) filtriert und im Eppendorf Concentrator auf etwa 1 mL eingeeengt, in einen 2 mL Messkolben überführt und bis zur Marke aufgefüllt. Der Extrakt wurde durch einen Spritzenvorsatzfilter (Wicom Perfect Flow, PPVDF, 13 mm, 0,2 µm) in ein HPLC-Vial filtriert und an der LC-MS gemessen (Kapitel 2.3.2).

2.4.4 Statistische Auswertung

Statistische Auswertungen aus Kapitel 3.1 wurden mit dem Tukey-Kramer LSD_{5%} Test des Programms CoStat-Statistical Software Version 3 von CoHort Software durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede verschiedener Varianten wurden mit folgenden Irrtumswahrscheinlichkeiten dargestellt:

>5,0 %	n.s.	= nicht signifikant
≤5,0 %	*	= signifikant
≤1,0 %	**	= hoch signifikant
≤0,1 %	***	= sehr hoch signifikant

In einigen Abbildungen in Kapitel 3.1 wurden zudem unterschiedliche Buchstaben verwendet, welche statistisch belegbare Unterschiede zwischen den Mittelwerten verschiedener Varianten mit 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit darstellen:

- a: unterscheidet sich signifikant von b und c
- ab: unterscheidet sich **nicht** signifikant von Variante a und b, unterscheidet sich signifikant von c
- b: unterscheidet sich signifikant von a und c
- c: unterscheidet sich signifikant von a und b

Die statistischen Auswertungen aus Kapitel 3.2 wurden mit verschiedenen Funktionen des Programms Microsoft Excel 2007 durchgeführt:

MEDIAN:	Medianwert
STABW:	Standardabweichung
MITTELWERT:	arithmetisches Mittel
MIN:	Minimalwert einer Wertemenge
MAX:	Maximalwert einer Wertemenge

Lineare und quadratische Regressionen wurden mit der Diagrammfunktion von Microsoft Excel 2007 erstellt, die Gleichungen der Regressionen wurden dem Tool „Trendline“ von Microsoft Excel 2007 entnommen.

3 Ergebnisse

3.1 Phosphorlöslichkeit aus Substraten sowie dem Gärrest einer Biogasanlage

Es gibt viele verschiedene Methoden um die pflanzenverfügbare P-Fraktion aus Substraten zu bestimmen. Methoden-Empfehlungen basieren meist auf dem Substrat, für welches sie ursprünglich optimiert wurden. Häufig werden Methoden jedoch auch adaptiert und für andere Substrate als ursprünglich vorgesehen verwendet. Im Wesentlichen unterscheiden sich die Methoden in der Probenvorbereitung, dem Extraktionsmittel sowie der Messmethodik. Im folgenden Kapitel wurde untersucht, welche der verfügbaren Methoden am besten geeignet ist, die Phosphorlöslichkeit in Gärresten abzubilden. Dabei wurden verschiedene Methodenvariationen vergleichend untersucht.

3.1.1 Einfluss der Probenvorbereitung auf die löslichen Phosphor-Gehalte

Um den Einfluss der Probenvorbereitung auf den Gehalt an löslichem P zu bestimmen, wurden die Proben wie in Kapitel 2.1 beschrieben homogenisiert, fraktioniert und aufgearbeitet. Es wurde der Einfluss des Zerkleinerns und des Vermahlens, des Trocknens und Einfrierens und des Befeuchtens der getrockneten Proben auf die Menge an löslichem P bestimmt. Es wurden Extraktionen mit Wasser und mit CAL durchgeführt, um die kurz- bzw. kurz- und mittelfristig pflanzenverfügbaren P-Gehalte zu ermitteln. Die CAL-Extraktion, welche für Böden verwendet wird, wurde ausgewählt, da diese laut Literatur für Untersuchungen von Gülle und Kompost eingesetzt werden kann und bereits auf Gärreste angewendet wurde. Diese Versuche wurden exemplarisch für eine Biogasanlage durchgeführt, die Hähnchenkot, Mais und Zuckerrübe als Substrate einsetzt.

In Abbildung 9 und Tabelle 15 sind die wasserlöslichen P-Gehalte für den Hähnchenkot und den Vollgärrest dargestellt, da diese Substrate auch direkt zur Düngung auf dem Feld ausgebracht werden. Im Falle des Gärrestes reduzierte die Trocknung den wasserlöslichen P-Anteil scheinbar nicht, die frischen Proben wiesen

sogar die niedrigsten Werte auf. Der Einfluss der Trocknung verhielt sich bei dem Hähnchenkot anders als bei dem Gärrest, die Extrakte der frischen Proben zeigten die höchsten P-Gehalte, während die getrockneten Proben niedrigere wasserlösliche P-Gehalte aufwiesen. Mit Ausnahme des getrockneten, unzerkleinerten Materials waren die Schwankungen durch die Trocknung beim Hähnchenkot wesentlich geringer als beim Gärrest. Die Messwerte der gefrorenen Variante lagen zwischen denen der frischen und getrockneten Proben.

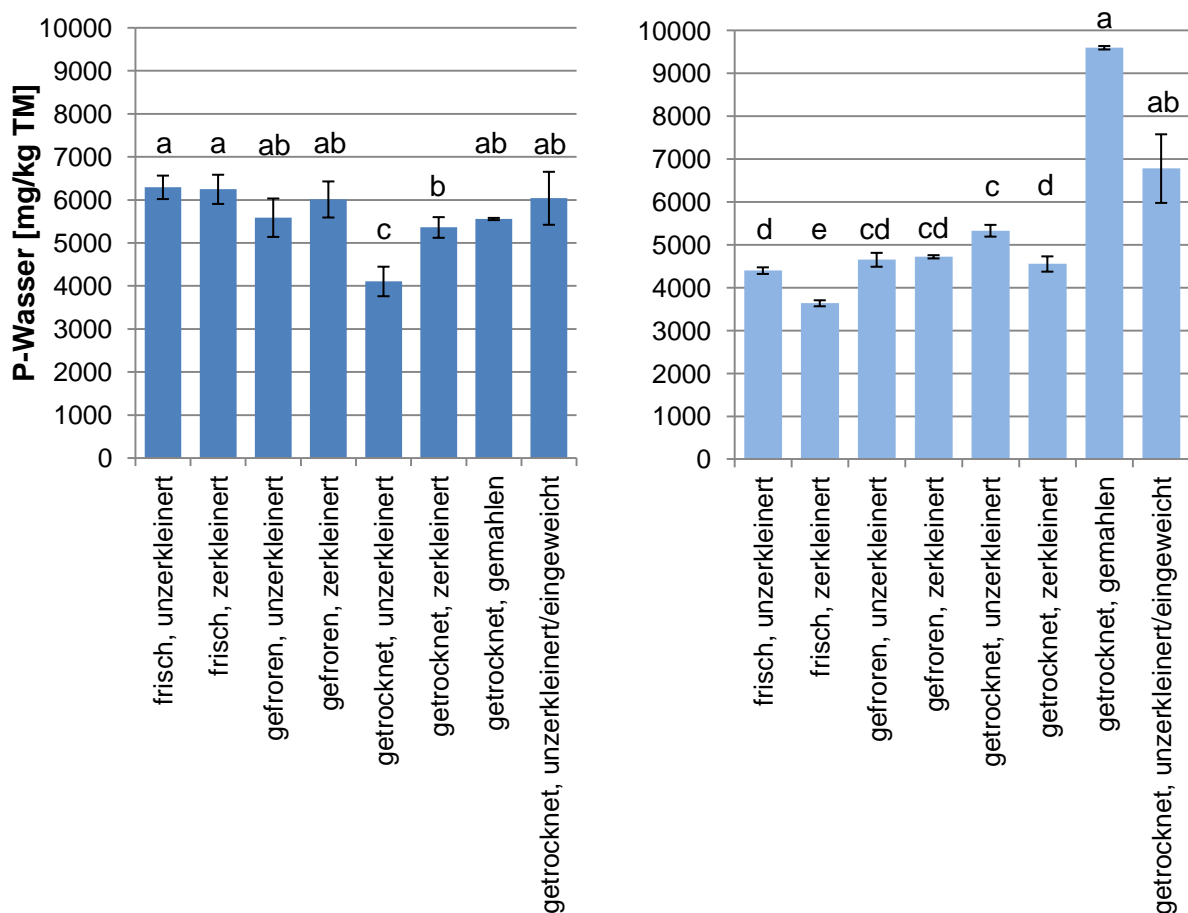


Abbildung 9: Wasserlösliches P [mg/kg TM] in Hähnchenkot (links) und Vollgärrest (rechts), bei verschiedenen Probenvorbereitungen (ICP-Messung); Tukey-Kramer $LSD_{5\%}$, unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede

Das Zerkleinern der Proben durch einen Stabmixer hatte auf frische Proben einen geringen Einfluss. Der nach dem Zerkleinern getrocknete Gärrest wies einen etwas geringeren wasserlöslichen P-Anteil auf als die unzerkleinerte und getrocknete

Probe. Umgekehrt erhöhte das vorherige Zerkleinern der Hähnchenkotprobe die P-Extraktionsrate. Die getrocknete und gemahlene Variante des Gärrestes wies einen ungewöhnlich hohen P-Gehalt auf, welcher fast dreimal so hoch war wie der des frischen Materials. Beim Hähnchenkot ergab sich durch Trocknen und Feinvermahlen kein weiterer Unterschied zu der getrockneten, zerkleinerten Probe.

Das Einweichen von getrocknetem, vermahlenem Material hatte einen positiven Einfluss auf die P-Extraktionsrate, die P-Werte der Extrakte von Hähnchenkot und Gärrest waren jeweils höher als die des getrockneten Materials.

Es konnte keine einheitliche Variante für Hähnchenkot und Gärrests festgelegt werden, da die P-Wasser-Werte für die beiden Probenarten bei verschiedenen Aufarbeitungen sehr verschieden waren. Während sich für Hähnchenkot als Alternative zum Frischmaterial am ehesten gefrorenes, zerkleinertes oder getrocknetes, gemahlene Material empfahl, eignete sich beim Vollgärrest gefrorenes, unzerkleinertes oder getrocknetes, zerkleinertes Material. Die höchsten Extraktionsraten bei Hähnchenkot wurden mit frischem, unzerkleinertem Material erzielt.

Tabelle 15: Wasserlösliche P-Gehalte [mg/kg TM] von Eingangssubstraten, Prozessschritten und Endprodukten einer Biogasanlage (ICP-Messwerte), bei verschiedenen Probenaufarbeitungen

	frisch		gefroren		getrocknet bei 40 °C			GEM
	ZK	UZK	ZK	UZK	ZK	UZK	UZK/EIN	
Substrate								
Mais	1628	1535	1733	1672	1558	1567	1540	1725
Zuckerrübe	456	401	832	744	577	840	953	907
Hähnchenkot	6249	6295	6013	5589	5362	4108	6040	5559
Prozess								
Fermenter	3980	4064	4101	4117	3169	5042	6270	8670
Nachgärer	4091	3308	4418	4469	3387	4625	6776	8773
Endprodukte								
Gärrest	3639	4401	4723	4654	4555	5331	6781	9600
Gärrest (fest)	2129	3729	3547	4321	4098	3493	3809	6799
Gärrest (flüssig)	-	6144	4599	4298	4943	7379	8972	9615

ZK: zerkleinert, UZK: unzerkleinert, EIN: eingeweicht, GEM: gemahlen

Abbildung 10 zeigt die P-Gehalte der CAL-Extrakte vom Hähnchenkot und Gärrest bei den verschiedenen Aufarbeitungsmethoden. Der Vergleich zwischen frischen und gefrorenen Proben zeigte keine großen Unterschiede, was auf einen geringen Einfluss der Probenaufarbeitung schließen lässt. Der Einfluss der Trocknung war größer, insbesondere die getrockneten Gärrestproben wiesen wesentlich geringere Extraktionsraten auf als die frischen Proben.

Das Zerkleinern der Proben hatte bei frischen und gefrorenen Proben keinen Einfluss auf die P-Extraktion, bei getrocknetem Material wurde die Extraktionsrate leicht erhöht. Getrocknete, gemahlene Varianten wiesen ähnliche P-Gehalte wie die frischen Proben auf, was sie zu einer Alternative zur Extraktion aus dem Frischmaterial macht. Das Einweichen von getrocknetem Material erhöht die P-Extraktionsrate, welche jedoch bei frischem, gefrorenem und vermahlenem Material höher war als in der eingeweichten Variante.

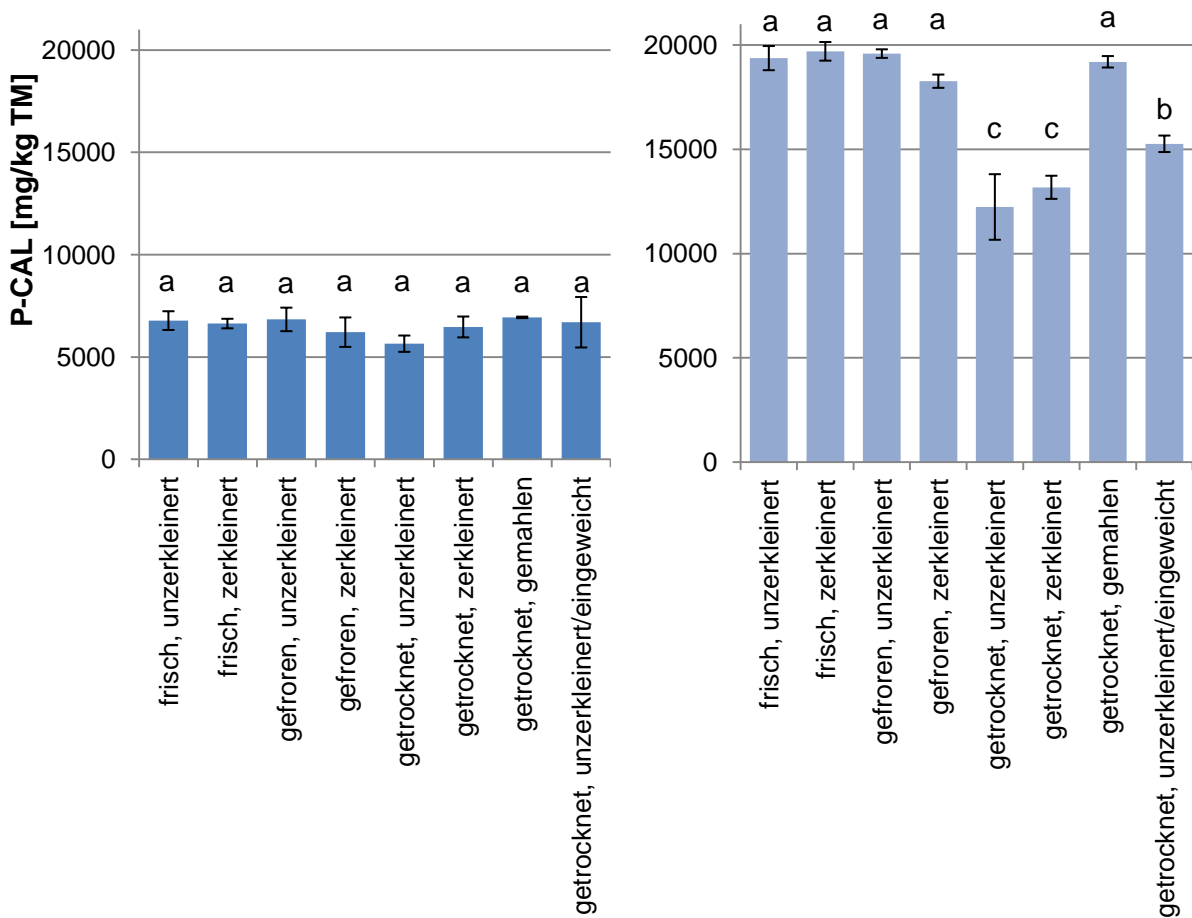


Abbildung 10: CAL-lösliches P [mg/kg TM] in Hähnchenkot (links) und Vollgärrest (rechts), bei verschiedenen Probenaufbereitungen (ICP-Messung); Tukey-Kramer $LSD_{5\%}$, unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede

Der Einfluss der Probenvorbereitung war bei der CAL-Extraktion deutlich geringer als bei der mit Wasser. Die Extrakte aus getrockneten, vermahlenden Proben zeigten ähnliche Ergebnisse wie die aus frischem Material, scheinen also den pflanzenverfügbaren P-Anteil gut abzubilden.

Tabelle 16: CAL-lösliche P-Gehalte [mg/kg TM] von Eingangssubstraten, Prozessschritten und Endprodukten einer Biogasanlage (ICP-Messwerte), bei verschiedenen Probenaufarbeitungen

	frisch		gefroren		getrocknet bei 40 °C			
	ZK	UZK	ZK	UZK	ZK	UZK	UZK/EIN	GEM
Substrate								
Mais	1414	1642	1616	1547	1633	1618	1351	1700
Zuckerrübe	595	578	671	659	671	772	846	814
Hähnchenkot	6632	6776	6210	6834	6466	5647	6696	6934
Prozess								
Fermenter	12262	11889	10778	11933	8960	10819	10661	12835
Nachgärer	13967	14536	12789	12789	10484	7511	13439	14126
Endprodukte								
Gärrest	19700	19375	18268	19591	13177	12233	15265	19199
Gärrest (fest)	8827	8487	8219	8092	7366	6854	8052	7933
Gärrest (flüssig)	-	13586	12865	14694	10445	10445	13434	14810

ZK: zerkleinert, UZK: unzerkleinert, EIN: eingeweicht, GEM: gemahlen

3.1.2 Einfluss des Extraktionsmittels und der Messmethode (Kolorimetrie versus ICP) auf die ermittelte Fraktion an pflanzenverfügbarem Phosphor

Um die pflanzenverfügbaren P-Fractionen abzubilden, wurden die Proben mit verschiedenen Extraktionsmitteln extrahiert. Die Extraktion mit Wasser ist am besten geeignet um den Gehalt von kurzfristig pflanzenverfügbarem P zu bestimmen, da mit Wasser nur sehr leicht lösliche Fraktionen erfasst werden. Die CAL- und NAC-Extraktionslösungen sind beide im sauren pH-Bereich, was ihre Extraktionsstärke im Vergleich zu Wasser erhöht. Sie lösen kurz- und mittelfristig pflanzenverfügbare Phosphorfractionen. Für den Gesamtphosphorgehalt wurde ein Totalaufschluss mit Königswasser durchgeführt, welcher in der Lage ist auch schwerlösliche P-Fractionen zu lösen.

Die P-Gehalte in Wasser-, CAL- und NAC-Extrakten wurden jeweils kolorimetrisch als auch per ICP-OES bestimmt (Tabelle 17). Erwartungsgemäß sollten die ICP-

Messwerte über denen der kolorimetrischen Messung liegen, da die ICP-OES im Gegensatz zur kolorimetrischen Methode auch organisch gebundenes P erfasst. Es zeigte sich jedoch, dass die kolorimetrischen Messwerte der Wasser-Extrakte des Pflanzenmaterials und der Gärreste häufig höher waren als die der ICP-OES. Im Fall der CAL-Extrakte lagen die kolorimetrisch ermittelten Messwerte einzelner Varianten sogar zum Teil höher als der ermittelte Gesamtphosphorgehalt, was darauf hindeutet, dass die kolorimetrischen Messwerte den tatsächlichen Phosphorgehalt zum Teil deutlich überschätzen. Die statistische Analyse über alle Aufarbeitungsvarianten zeigte jedoch nur bei Hähnchenkot eine signifikante Abweichung zwischen den Messmethoden. Mit steigender Acidität sollten die Extrakte höhere Phosphorgehalte aufweisen und somit sollte der P-Gehalt der Königswasseraufschlüsse höher sein als der der CAL-Extrakte. Werden nur die ICP-OES Messwerte der unterschiedlichen Extrakte betrachtet, so findet sich wie erwartet der höchste P-Gehalt im Königswasserextrakt, gefolgt von CAL, NAC und Wasser mit den geringsten P-Gehalten. Die Messungen weisen darauf hin, dass die Kolorimetrie nicht geeignet ist in Extrakten aus organischen Substraten den P-Gehalt sicher zu bestimmen. Daher basieren alle weiteren dargestellten Werte, sowie auch die unter 3.1.1. dargestellten Ergebnisse auf ICP-OES-Messungen.

Tabelle 17: Vergleich der kolorimetrischen mit der ICP-OES-Messung von Wasser- und CAL-Extrakten; (Tukey-Kramer LSD _{5%}) 1-faktoriell über alle Varianten, (n=32; für Wasser und CAL getrennt)

[mg P/kg TM]				
	Wasserextr.	Mais	Zuckerrübe	Hähnchenkot
Kolorimetrie		1949	728	5496
ICP		1620	714	5652
LSD _{5%}		178	98	661
	Wasserextr.	Fermenter	Nachgärer	Gärrest
Kolorimetrie		5697	5780	6671
ICP		4927	4981	5461
LSD _{5%}		848	886	1008
	Wasserextr.	Gärrest (fest)	Gärrest (flüssig)	
Kolorimetrie		4772	6836	
ICP		3991	6512	
LSD _{5%}		588	1045	
	CAL	Mais	Zuckerrübe	Hähnchenkot
Kolorimetrie		1600	670	5637
ICP		1565	699	6524
LSD _{5%}		102	68	306
	CAL	Fermenter	Nachgärer	Gärrest
Kolorimetrie		11799	12681	17367
ICP		11328	12596	17101
LSD _{5%}		778	1597	1973
	CAL	Gärrest (fest)	Gärrest (flüssig)	
Kolorimetrie		7896	12775	
ICP		7979	12710	
LSD _{5%}		723	1532	

3.1.3 P-Extrahierbarkeit von Substraten und Gärresten im Vergleich

In Tabelle 18 sind die prozentualen Anteile der extrahierten P-Fractionen bezogen auf den Gesamt-P-Gehalt dargestellt. Die pflanzlichen Substrate Mais und Zuckerrübe enthielten wesentlich weniger Phosphor als der Hähnchenkot, welcher 9380 mg/kg Trockenmasse aufwies. Durch den Prozess wurde Phosphor aufkonzentriert und die Konzentration stieg im Vergleich mit den Eingangssubstraten

im Fermenter über den Nachgärer hin zum Gärrest an. Bezogen auf die Trockenmasse besaß der flüssige Gärrest einen höheren P-Gehalt als der abgepresste Feststoff, wird der Wert jedoch auf die Frischmasse berechnet ergeben sich Werte von 2907 mg/kg für den festen Gärrest, 1405 mg/kg für den flüssigen Gärrest und 2662 mg/kg für den Vollgärrest.

Die Wasser- und CAL-Löslichkeit des P der Substrate Mais, Zuckerrübe und Hähnchenkot lag zwischen 59 und 86 % vom Gesamt-P-Gehalt, bei NAC lag sie bei Hähnchenkot und Zuckerrübe etwas niedriger bei 49 %. Die P-CAL- und P-NAC-Gehalte des Fermenters, Nachgärers und des Gärrests unterschieden sich wenig und lagen zwischen 71 – 94 % des Gesamt-P, während die P-Wasser-Gehalte etwas niedriger zwischen 43 – 76 % lagen. Statistisch sind die Ergebnisse der CAL- und NAC-Extraktion vergleichbar (Tabelle 19).

Tabelle 18: Prozentualer Anteil der extrahierten P-Fractionen am Gesamt-P-Gehalt (getrocknetes gemahlene Material)

Probe	P-Wasser [% von Gesamt-P]	P-CAL [% von Gesamt-P]	P-NAC [% von Gesamt-P]	Gesamt-P [mg/kg TM]
Substrate				
Mais	86	85	78	2001
Zuckerrübe	70	63	49	1302
Hähnchenkot	59	74	49	9380
Prozess				
Fermenter	63	93	96	13800
Nachgärer	49	79	86	17880
Endprodukte				
Gärrest	43	87	94	22186
Gärrest (fest)	76	88	71	9000
Gärrest (flüssig)	52	80	89	18488

Tabelle 19: Vergleich Wasserextrakt mit CAL und NAC für die Variante 40 °C getrocknet und vermahlen (Vergleich über alle 8 Probenmaterialien; n=32; Tukey-Kramer LSD _{5%})

	[mg P/kg TM]	
	P-kolorimetrisch	P-ICP
Wasserextrakt	6460	6456
CAL	10595	9793
NAC	9905	10653
LSD _{5%}	3044	2845

Generell waren die in den Eingangssubstraten und Gärresten enthaltenen P-Fraktionen zu großen Teilen sehr gut löslich. Beim direkten Vergleich des Hähnchenkots, welcher auch direkt zur Düngung eingesetzt werden kann, mit dem Gärrest, war bei P-Wasser eine Abnahme der Löslichkeit von 59 % auf 43 % zu beobachten. Der P-CAL-Wert stieg durch den Prozess von 74 % auf 87 % und der P-NAC-Wert von 49 % auf 94 %. Bei P-Wasser ist somit eine Abnahme und bei P-CAL und P-NAC eine Zunahme der löslichen Anteile durch die Fermentation erkennbar. Da die CAL- und NAC-Extraktion die wasserlöslichen P-Fraktionen ebenfalls extrahieren, ist insgesamt ein Anstieg der verfügbaren P-Gehalte durch die Vergärung erkennbar.

3.2 Antibiotikagehalte in Wirtschaftsdüngern, Klärschlämmen und Biogasanlagen-Gärresten aus Deutschland, Schweden und Finnland

Antibiotika können durch Abwässer oder Düngung mit kontaminierter Gülle, Klärschlämmen und Gärresten in die Umwelt gelangen und dort die Bodenfauna beeinflussen. Da viele Biogasanlagen als Co-Substrat der Vergärung tierische Exkrememente verwenden, stellt sich die Frage, ob sich die Konzentration der enthaltenen Antibiotika durch den Prozess verändert. Alle beprobten Anlagen arbeiteten kontinuierlich und die Proben der Eingangssubstrate und Endprodukte wurden am selben Tag genommen, weshalb es nicht möglich ist Abbauraten aus den Ergebnissen abzuleiten. Es ist jedoch möglich die Häufigkeit des Auftretens der Antibiotika und die Mediane der Konzentrationen zu vergleichen, um zu ermitteln ob die Vergärung einen Einfluss auf die Antibiotikakonzentration hat.

In den Tabellen dieses Kapitels sind jeweils alle Eingangssubstrate (ausgenommen der pflanzlichen) und Endprodukte der verschiedenen Anlagen aufgeführt. Da die 32 beprobten Anlagen häufig mehrere Eingangssubstrate verwendeten und Gärreste bei einigen Anlagen in feste und flüssige Gärreste separiert wurden kommt somit eine größere Probenanzahl zustande, als die Anzahl der beprobten Anlagen.

3.2.1 Antibiotikagehalte in Substraten der Biovergasung im Vergleich

Bei den untersuchten Eingangssubstraten handelte es sich um Gülle und Mist tierischen Ursprungs sowie Klärschlamm aus kommunalen Klärwerken. Von den 43 untersuchten Eingangssubstraten der Biovergasung enthielten 34 Spuren von Antibiotika, in 16 dieser Proben konnte mehr als ein Antibiotikum gleichzeitig ermittelt werden (Tabelle 20). Bei den tierischen Eingangssubstraten waren über 58 % der Substrate mit quantifizierbaren Antibiotikamengen (>Bestimmungsgrenze) kontaminiert, alle untersuchten Klärschlämme enthielten Antibiotika.

Tabelle 20: Häufigkeit der Kontamination der Eingangssubstrate (* Werte über der Nachweis- (LOD), aber unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ))

Substrat	Anzahl Proben	n > LOQ	n > LOD*	n < LOD	Häufigkeit der Kontamination [%]
Geflügel	9	5	1	3	67
Rind	12	6	1	5	58
Schwein	9	8	0	1	89
Mischsubstrate	2	1	1	0	100
Klärschlamm	11	11	0	0	100
Gesamt	43	31	3	9	79

In den Geflügelkot-Proben fanden sich die Fluorchinolone besonders oft, Enrofloxacin lag 4 mal, Ciprofloxacin 2 mal über der Bestimmungsgrenze, Sulfonamide und Tetracyclin wurden ebenfalls detektiert (Tabelle 21). In Rindergülle waren Tetracycline und Enrofloxacin enthalten, die Konzentrationen von Enrofloxacin

und Tetracyclin waren jedoch geringer als in den Substraten aus der Geflügelhaltung. In den Schweinegülle wurden am häufigsten Tetracycline detektiert, gefolgt von Sulfadiazin und Enrofloxacin. Alle untersuchten Klärschlämme enthielten Antibiotikagehalte über den Bestimmungsgrenzen, die mit Abstand häufigsten Antibiotika in diesem Eingangssubstrat waren Ciprofloxacin und Tetracyclin.

Tabelle 21: Mediane der Antibiotikagehalte der Eingangssubstrate nach Tierart und deren Häufigkeit [$\mu\text{g}/\text{kg TM}$] (Mediane aus Werten über dem LOQ)

Substrat	n	SD	SM	CP	EN	DF	TC	OTC	CTC
Geflügel	9	48,8	28,3	807	3268	-	8180	-	-
n (>LOQ)	5	2	1	2	4	-	1	-	-
Rind	12	-	-	-	83,9	-	127	660	-
n (>LOQ)	6	-	-	-	2	-	2	3	-
Schwein	9	151	-	-	41,3	-	113	1426	-
n (>LOQ)	8	3	-	-	1	-	1	5	-
Rind+Schwein	2	24,4	-	-	27,2	-	41,9	-	843
n (>LOQ)	1	1	-	-	1	-	1	-	1
Klärschlamm	11	18,0	-	872	39,2	-	1204	-	-
n (>LOQ)	11	3	-	11	1	-	8	-	-

SD: Sulfadiazin, SM: Sulfamethazin, CP: Ciprofloxacin, EN: Enrofloxacin, DF: Difloxacin, TC: Tetracyclin, OTC: Oxytetracyclin, CTC, Chlortetracyclin

Das am häufigsten detektierte Antibiotikum war Enrofloxacin, gefolgt von Sulfadiazin, Ciprofloxacin, Tetracyclin und Oxytetracyclin. Sulfamethazin und Chlortetracyclin wurden jeweils in einer Probe der Eingangssubstrate nachgewiesen, während Difloxacin nicht detektiert wurde (Tabelle 22). In einem Putenkot konnten 5 der 8 untersuchten Antibiotika nachgewiesen werden. Die höchste festgestellte Konzentration war $8625 \mu\text{g}$ Enrofloxacin/kg TM in einem Hähnchentrockenkot. Die Mediane von Sulfadiazin, Sulfamethazin und Enrofloxacin lagen zwischen 28 und $82 \mu\text{g}/\text{kg TM}$, während die von CP, TC, OTC und CTC mit $842 - 906 \mu\text{g}/\text{kg TM}$ deutlich höher lagen. Die Antibiotikakonzentration in einzelnen Proben lag teilweise deutlich über dem Median, die höchste Enrofloxacin-Konzentration lag über das 100-fache darüber.

Tabelle 22: Mediane der Antibiotikagehalte der 43 untersuchten Eingangssubstrate [$\mu\text{g}/\text{kg}$ TM] (Mediane aus Werten über dem LOQ)

	SD	SM	CP	EN	DF	TC	OTC	CTC
n (<LOQ, >LOD)	5	-	2	8	-	2	3	-
n (>LOQ)	10	1	13	10	-	13	8	1
Median	69,9	28,3	872	81,6	-	906	883	843
Max	787	28,3	1969	8626	-	8180	7781	843

SD: Sulfadiazin, SM: Sulfamethazin, CP: Ciprofloxacin, EN: Enrofloxacin, DF: Difloxacin, TC: Tetracyclin, OTC: Oxytetracyclin, CTC, Chlortetracyclin

3.2.2 Antibiotikagehalte im Endprodukt der Biovergasung

In den Endprodukten der Biovergasung fanden sich in 34 von 44 Proben Antibiotikarückstände, in 19 dieser Proben wurde mehr als ein Antibiotikum gleichzeitig ermittelt (Tabelle 23). Ein Vollgärrest, welcher aus der Vergärung von pflanzlichem Material und Putenmist resultierte, enthielt 6 verschiedene Antibiotika. In Gärresten aus Wirtschaftsdüngern wurden in 50 – 100 % der Proben Antibiotika nachgewiesen, in Klärschlämmen fanden sich zu 100 % Antibiotika.

Tabelle 23: Häufigkeit der Kontamination der Endprodukte (* Werte über der Nachweis-(LOD), aber unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ))

Substrat	Anzahl			Häufigkeit der Kontamination [%]
	Proben	n >LOQ	n >LOD* n <LOD	
Geflügel	9	9	-	100
Rind	5	3	1	80
Schwein	4	2	2	50
Mischsubstrate	10	6	3	70
Struvit/NP				
Konzentrat	2	1	-	100
Klärschlamm	14	13	-	100
Gesamt	44	34	6	86

Tabelle 24 zeigt die Gärreste kategorisiert nach ihren Eingangssubstraten. Da viele Biogasanlagen mehrere Eingangssubstrate verwenden, gibt es neben den Gärresten welche auf einzelnen Substraten basieren eine Vielzahl an verschiedenen Kombinationen von tierischen Güllen und Mist. Aufgrund der vielen Gärrest-Varianten ist die Stichprobenanzahl für die einzelnen Varianten zum Teil sehr gering und lässt sich nicht verallgemeinern. Die Kategorie mit den meisten Stichproben waren die Klärschlämme, in denen fast ausschließlich Ciprofloxacin und Tetracyclin detektiert wurden, dessen Mediane mit 851 bzw. 431 µg/kg TM höher waren als in anderen Proben. Zugleich waren mit 13 von 14 Proben fast alle Klärschlämme mit Konzentrationen oberhalb der Bestimmungsgrenze belastet. Höhere Tetracyclinkonzentrationen konnten nur in Gärresten aus Geflügelmist festgestellt werden. Vergleicht man die Proben welche nur Exkremente einer Tierart enthalten stellt man fest, das Gärreste aus Geflügelmist in allen Fällen kontaminiert waren und fast alle Proben Enrofloxacin enthielten. In Geflügelmist-Gärresten waren bis auf Difloxacin und Chlortetracyclin alle Antibiotika, die in dieser Studie untersucht wurden, zu finden, während in Rindergülle-Gärresten nur Sulfadiazin, Enrofloxacin und Oxytetracyclin auftraten. Die Mischproben, welche mehr als ein potentiell kontaminiertes Substrat enthielten, wiesen eine zu den restlichen Proben vergleichbare Kontaminierung auf, was sich aufgrund der geringen Gesamtzahl der Proben jedoch schwer verallgemeinern lässt.

Tabelle 24: Mediane der Antibiotikagehalte der Endprodukte nach Tierart und deren Häufigkeit [$\mu\text{g}/\text{kg}$ TM] (Mediane aus Werten über dem LOQ)

Art des Eingangs- substrates	n	SD	SM	CP	EN	DF	TC	OTC	CTC
Geflügel	9	254	59,0	121	402	-	15148	236	-
n (>LOQ)	9	3	3	1	8	-	3	3	-
Rind	5	233	-	-	147	-	-	196	-
n (>LOQ)	3	1	-	-	1	-	-	1	-
Schwein	4	142	-	-	44,2	-	-	1258	-
n (>LOQ)	2	1	-	-	1	-	-	2	-
Rind+Schwein	4	75,3	-	-	-	-	-	-	-
n (>LOQ)	2	1	-	-	-	-	-	-	-
Klärschlamm	14	12,4	-	851	22,9	-	461	-	-
n (>LOQ)	13	1	-	11	1	-	7	-	-
Rind+Geflügel	2	-	77,1	-	-	-	-	193	-
n (>LOQ)	1	-	1	-	-	-	-	1	-
NP-Konzentrat /Struvit	2	-	-	27,7	-	-	-	-	-
n (>LOQ)	1	-	-	1	-	-	-	-	-
Schwein+ Klärschlamm	2	26,2	-	63,1	47,7	-	437	-	-
n (>LOQ)	2	2	-	1	2	-	2	-	-
Geflügel+ Schwein	1	231	-	-	-	-	-	-	-
n (>LOQ)	1	1	-	-	-	-	-	-	-
Geflügel+ Schwein+ Rind	1	-	-	-	-	-	-	-	-
n (>LOQ)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

SD: Sulfadiazin, SM: Sulfamethazin, CP: Ciprofloxacin, EN: Enrofloxacin, DF: Difloxacin, TC: Tetracyclin, OTC: Oxytetracyclin, CTC, Chlortetracyclin

Die höchste Konzentration eines Antibiotikums wurde mit fast 30 mg Tetracyclin/kg TM in einer mechanisch separierten, flüssigen Phase eines Gärrests aus Putenmist festgestellt (Tabelle 25). Am häufigsten wurden Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Tetracyclin und Sulfadiazin detektiert, während Chlortetracyclin und Difloxacin in den Gärresten nicht enthalten waren. Die höchsten Mediankonzentrationen wurden mit

513 und 561 mg/kg TM für Ciprofloxacin und Tetracyclin festgestellt, welche über denen von Enrofloxacin und Oxytetracyclin lagen. Die Mediane der Sulfonamide lagen deutlich unter denen der anderen Antibiotikaklassen.

Tabelle 25: Mediane der Antibiotikagehalte der 44 untersuchten Endprodukte [$\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]

	SD	SM	CP	EN	DF	TC	OTC	CTC
n (<LOQ, >LOD)	4	1	1	3	-	1	2	-
n (>LOQ)	12	3	16	14	-	15	8	-
Median	88,0	59,0	561	234	-	513	196	-
Max	363	117	1.801	2.406	-	29.758	2.382	-

SD: Sulfadiazin, SM: Sulfamethazin, CP: Ciprofloxacin, EN: Enrofloxacin, DF: Difloxacin, TC: Tetracyclin, OTC: Oxytetracyclin, CTC, Chlortetracyclin

Von vier verschiedenen Gärresten standen die in feste und flüssige Phase separierten Fraktionen zur Verfügung. Die Stichprobenanzahl ist zu gering um allgemeine Aussagen zu treffen, jedoch fanden sich sowohl in flüssiger als auch fester Phase Antibiotika, was darauf hindeutet, dass Separation keine Möglichkeit ist Antibiotika abzuscheiden.

3.2.3 Substrate und Gärreste aus Deutschland, Schweden und Finnland im Vergleich

Es wurden Proben aus Deutschland, Finnland und Schweden analysiert, daher stellte sich die Frage, ob hinsichtlich der Kontamination der Proben länderspezifische Unterschiede auftreten (Tabelle 26). Die Eingangssubstrate aus Deutschland und Finnland waren zu 82 % bzw. 83 % mit Antibiotika belastet, während die Häufigkeit bei den schwedischen Proben mit 64 % etwas geringer ausfiel. Alle Gärreste aus Deutschland waren mit mindestens einem Antibiotikum kontaminiert, 81 % der finnischen und 86 % der schwedischen Proben enthielten Antibiotika. Unabhängig vom Herkunftsland waren alle Klärschlämme, sowohl Eingangssubstrate als auch Endprodukte mit Antibiotika belastet.

Tabelle 26: Anzahl der belasteten Proben sortiert nach Herkunftsland und Art der Eingangssubstrate (Tierart der Gülle) und Endprodukte

Art des Eingangssubstrates	Anzahl Eingangsmaterial	belastete Eingangsmaterialien (>LOD)	Anzahl Endprodukte	belastete Endprodukte (>LOD)
Deutschland				
Schwein	1	1	0	0
Geflügel	4	3	9	9
Rind	3	2	1	0
Klärschlamm	2	2	3	3
Struvit	-	-	1	1
Rind+Schwein	1	1	1	2
Rind+Geflügel	0	0	1	1
Summe	11	9	16	16
Finnland				
Schwein	6	5	4	2
Geflügel	1	1	0	0
Rind	5	3	3	3
Klärschlamm	6	6	8	8
Rind+Schwein	0	0	2	1
Rind+Geflügel	0	0	1	0
NP-Konzentrat	0	0	1	1
Schwein+ Klärschlamm	0	0	2	2
Summe	18	15	21	17
Schweden				
Schwein	2	1	0	0
Geflügel	3	1	0	0
Rind	4	2	1	1
Klärschlamm	3	3	3	3
Rind+Schwein	2	2	1	0
Rind+Schwein+ Geflügel	0	0	1	1
Geflügel+Schwein	0	0	1	1
Summe	14	9	7	6

In Tabelle 27 sind die Mediane der Konzentrationen der Eingangs- und Ausgangssubstrate nach ihren Herkunftsländern, sowie die Häufigkeit des Auftretens über der Nachweisgrenze, jedoch unter der Bestimmungsgrenze (<LOQ) und über der Bestimmungsgrenze (>LOQ) aufgeführt. Bezogen auf die Sulfonamide lässt sich erkennen, dass die Konzentrationen in den Eingangssubstraten niedriger waren als in den Ausgangssubstraten. Länderspezifisch ist die Tatsache, dass Sulfamethazin in insgesamt 5 deutschen Proben nachgewiesen wurde, während in den Proben der anderen Länder keines enthalten war. Auffällig ist, dass Enrofloxacin in den schwedischen Proben nur einmal detektiert wurde, während es in 68 % der deutschen und 36 % der finnischen Proben zu finden war. Der Median der Enrofloxacin Konzentration lag in den deutschen Proben 10-fach über dem der finnischen Proben, wobei zu berücksichtigen ist, dass in Deutschland mehr Biogasanlagen beprobt wurden, die Geflügelmist als Substrat einsetzen. Je nach Herkunftsland war in 30 – 39 % der Proben Ciprofloxacin enthalten, wobei die höchsten Konzentrationen in deutschen Proben festgestellt wurden. Unterschiede in der Nachweis-Häufigkeit von Tetracyclin waren mit 30 – 38 % zwischen den Ländern ebenso wenig ausgeprägt, wie die von Oxytetracyclin mit 18 – 30 %. Chlortetracyclin fand sich ausschließlich in einer deutschen Probe. Die finnischen und schwedischen Eingangssubstrate wiesen fast doppelt so hohe Tetracyclinegehalte wie die Gärreste auf, bei den deutschen Proben war der Wert in den Endprodukten zwar höher, hier ist jedoch zu berücksichtigen, dass 3 von 5 Gärresten aus der gleichen, sehr hoch belasteten Anlage stammten.

Tabelle 27: Mediane der Eingangssubstrate und Endprodukte nach Herkunftsland [$\mu\text{g}/\text{kg TM}$]

	SD	SM	CP	EN	DF	TC	OTC	CTC
Deutschland (28 Proben)								
Eingangssubstrate	42,2	31,2	1315	2629	-	130	1744	809
Endprodukte	113	56,3	874	369	-	4161	228	-
Gesamt	91,3	37,4	1228	622	-	254	276	809
n <LOQ	2	1	2	6		1	2	0
n >LOQ	7	4	9	13	0	9	5	1
Finnland (39 Proben)								
Eingangssubstrate	34,2	-	855	58,9	-	1152	1411	-
Endprodukte	43,3	-	490	63,5	-	445	201	-
Gesamt	42,4	-	526	61,6	-	496	412	-
n <LOQ	5	0	1	4	0	2	0	0
n >LOQ	8	0	13	10	0	13	7	0
Schweden (20 Proben)								
Eingangssubstrate	84,8	-	809	-	-	2245	588	-
Endprodukte	223	-	989	-	-	1192	-	-
Gesamt	106	-	809	-	-	1084	588	-
n <LOQ	3	0	0	1	0	0	3	0
n >LOQ	6	0	6	0	0	6	3	0

SD: Sulfadiazin, SM: Sulfamethazin, CP: Ciprofloxacin, EN: Enrofloxacin, DF: Difloxacin, TC: Tetracyclin, OTC: Oxytetracyclin, CTC, Chlortetracyclin

3.3 Toxikologie und Kombinationstoxikologie ausgewählter Antibiotika und Schwermetalle auf aquatische Organismen und Pflanzen

Um die Toxizität von Antibiotika und Schwermetallen auf die Umwelt zu erfassen wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Über kurze Zeiträume durchgeführte Toxkits können erste Hinweise auf die Toxizität einer Substanz liefern, die dann in Gefäßversuchen verifiziert werden können. Die Toxtests mit *Daphnia magna* sollten die Wirkung der Substanzen auf einen aquatischen Organismus simulieren, um den Einfluss einer möglichen Auswaschung von potentiell schädlichen Substanzen von Ackerflächen in Gewässer einschätzen zu können. Die Phytotoxizitätstests mit *Sinapis alba* erfassen die kurzfristigen Einflüsse der Substanzen auf die Keimung eines pflanzlichen Organismus. Da Beeinträchtigungen durch Schadsubstanzen in

dem sehr kurzen Untersuchungszeitraum der Toxkits möglicherweise nicht erfasst werden oder aber überschätzt werden, wurde zusätzlich ein Gefäßversuch mit *Sinapis alba* angelegt, um die Auswirkungen über die Wachstumsperiode zu untersuchen. Es ist nicht auszuschließen, dass sich die zu untersuchenden Substanzen im Sandboden anders verhalten als in den Lösungen der Toxkits (z.B. durch Adsorptionsvorgänge), weshalb als Bindeglied ein Hydrokulturversuch durchgeführt wurde. Dieser ermöglicht die Einschätzung der Toxizität über einen Zeitraum von mehreren Wochen, ohne jedoch Adsorptionsvorgänge welche in einem Boden ablaufen, zu berücksichtigen.

3.3.1 Ergebnisse der Toxkits zur Toxikologie von Antibiotika und Schwermetallen

Bei der Verwendung der Daphnien Toxkits konnten nur zum Teil verwertbare Ergebnisse erzeugt werden, da die Analyten teils mit den Bestandteilen des Standard-Frischwassers präzipitierten. Bei der Variante mit Tetracyclin trat ein brauner Niederschlag auf, welcher vermutlich auf die Präzipitation mit Eisenionen zurückzuführen ist. Da unklar ist, welche Mengen an Tetracyclin gebunden wurden und somit den Daphnien nicht mehr frei zugänglich waren, ist es nicht möglich die EC_{50} -Werte verlässlich zu berechnen. Gleiches gilt für Eisen, welches bei den benötigten Konzentrationen ebenfalls als Niederschlag ausfiel.

Es erwies sich zum Teil als schwierig den richtigen Konzentrationsbereich für die Tests zu finden, da zum Zeitpunkt der Zählung der immobilen Individuen in den niedrigen Konzentrationen möglichst kein betroffenes Individuum sein sollte, während in den hohen Konzentrationen möglichst alle immobil sein sollten. Für eine möglichst genaue Berechnung des EC_{50} -Werts müssen in den Zwischenkonzentrationen jeweils mobile und immobile Individuen vorhanden sein, was die Konzentrationsspanne, über die getestet wird, begrenzt. Zudem sollten diese Kriterien nach 24 und 48 Std. eingehalten werden, um beide Werte berechnen zu können. In Tabelle 28 sind die berechneten EC_{50} -Werte der getesteten Substanzen aufgeführt. Es fällt auf, dass die Antibiotika Enrofloxacin und Sulfadiazin höhere Effektkonzentrationen als die Schwermetalle aufwiesen. Die Effektkonzentrationen

nach 48 Std. waren deutlich niedriger als nach 24 Std., da nach längerer Zeit mehr Individuen immobilisiert sind.

Tabelle 28: Effektkonzentrationen der getesteten Substanzen auf *Daphnia magna* im Daphtoxkit F™ Magna

	EC ₅₀ 24h [mg/L]	EC ₅₀ 48h [mg/L]
Enrofloxacin	20,5	15,5
Sulfadiazin	47,9	10,6
Kupfer	0,17	0,11
Zink	1,60	3,89x10 ⁻³

Tetracyclin und Eisen fielen unter Testbedingungen im Nährmedium aus, weshalb eine Bestimmung der Effektkonzentration nicht möglich war

Neben den Toxkits mit Daphnien wurden Phytotestkits mit *Sinapis alba* verwendet, um die Toxizität der Substanzen auf Pflanzen zu bestimmen. In den Phytotestkits wurde die Verminderung des Wurzelwachstums nach 5 Tagen bestimmt (Abbildung 11). Enrofloxacin ist bei neutralem pH-Wert praktisch unlöslich, weshalb von der Versuchsvorschrift, welche vorsieht den Analyten in dest. Wasser zu lösen, abgewichen und stattdessen ein Citronensäure-Citrat Puffer mit pH 6,0 gewählt wurde. Das Verwenden des Puffers hat zudem den Vorteil, dass eine pH-Wert Änderung durch Lösen des Analyten vermieden wird. Die Wahl des richtigen Puffersystems und der richtigen Konzentration bereitete zunächst Schwierigkeiten, da ein Puffer gefunden werden musste in dem alle zu testenden Substanzen gleichermaßen löslich sind. Des Weiteren darf die Konzentration des Puffers nicht zu hoch sein, da das Wurzelwachstum sonst durch den Puffer an sich behindert werden kann. So erwies sich eine Konzentration von 4,6 g/L des Citronensäure-Citrat Puffers als zu hoch, da die Keimlinge kaum noch Wachstum zeigten. Als geeignet stellte sich ein Citronensäure-Citrat Puffer bei pH 6,0 mit einer Konzentration von 0,5 g/L heraus.

Bei den drei untersuchten Antibiotika Enrofloxacin, Sulfadiazin und Tetracyclin konnte eine Reduktion des Wurzelwachstums innerhalb von 5 Tagen beobachtet werden. Vergleicht man die Reduktion des Wurzelwachstums bei jeweils 150 mg/L (Tabelle 29) so ist erkennbar, dass Sulfadiazin gefolgt von Tetracyclin und

Enrofloxacin die höchste Toxizität aufwies. Im Fall von Kupfer wurde bei einer Konzentrationen unter 6 mg/L Kupfer eine Förderung des Wurzelwachstums beobachtet.

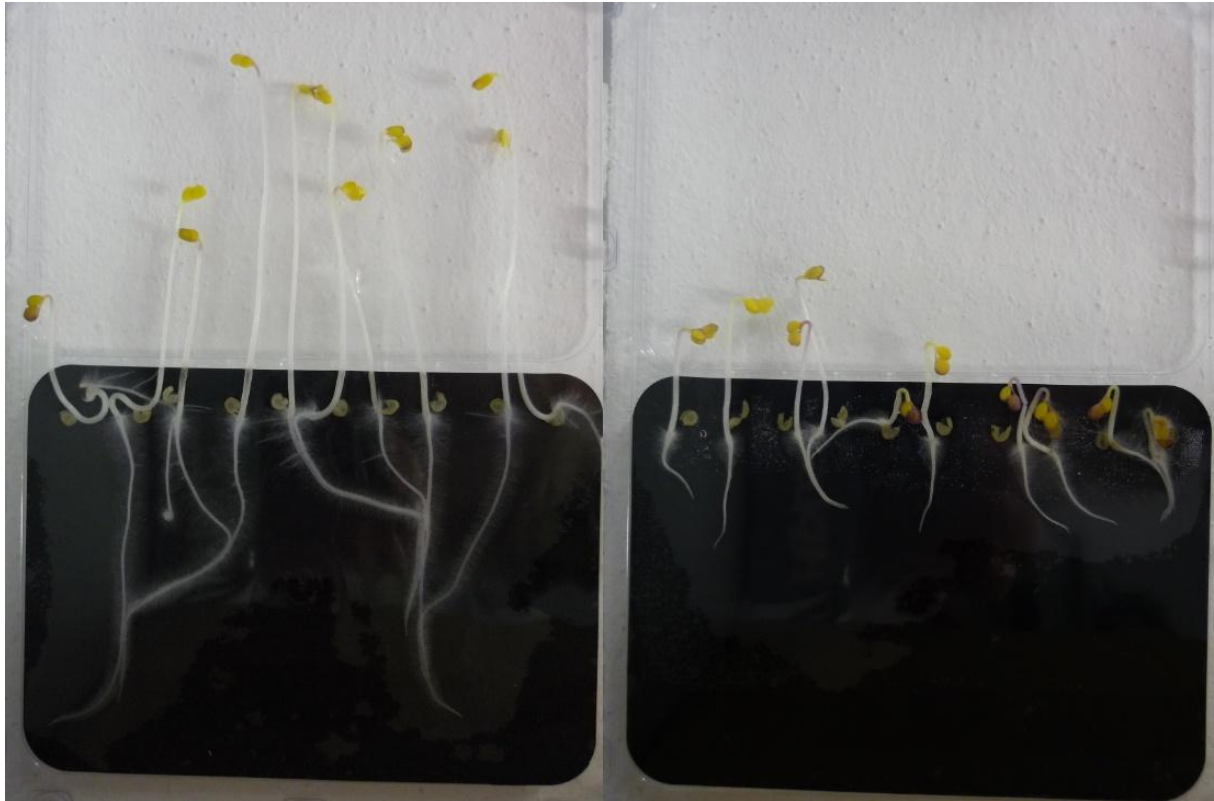


Abbildung 11: Vergleich der Wurzellängen von *Sinapis alba* im Phytotestkit nach 5 Tagen, links Kontrolle, rechts Tetracyclin 300 mg/L

Um die Toxizitäten der einzelnen Stoffe besser miteinander vergleichen zu können wurde aus den Kurven in Abbildung 12 die jeweilige Konzentration berechnet, bei der eine 50 und 70 %ige Reduktion des Wurzelwachstums nach 5 Tagen eintreten würde. Die Graphen in Abbildung 12 flachen mit steigender Konzentration immer mehr ab, was jedoch nicht bedeutet, dass bei beliebig hoher Konzentration der Effekt nicht mehr zunimmt. Die Berechnung der Effektkonzentrationen ist somit nur in dem betrachteten Konzentrationsbereich möglich. Für Kupfer konnte keine EC_{50} -Konzentration berechnet werden, da bei den verwendeten Konzentrationen keine 50 %ige Reduktion erreicht werden konnte und der Graph nicht für eine Extrapolation der EC_{50} -Konzentration geeignet ist.

Beim Vergleich der EC_{50} -Konzentrationen zeigt sich, dass Sulfadiazin mit Abstand die größte Reduktion des Wurzelwachstums bewirkt hat. Um den gleichen Effekt mit

Enrofloxacin oder Tetracyclin zu erreichen ist etwa die 7- bzw. 11-fache Menge nötig. Um einen toxischen Effekt bei Kupfer zu beobachten war die Testphase von 5 Tagen zu kurz. Aufgrund des Aufbaus des Tests, welcher ohne Nährstoffe und Licht auskommt, kann der Versuch nicht länger als 5 Tage durchgeführt werden, da aufgrund des Nährstoff- und Lichtmangels das Wachstum praktisch zum Erliegen kommt. Aus diesem Grund wurde ein Hydrokulturversuch über mehrere Wochen durchgeführt (Kap. 2.4.2), um die Wirkung von Kupfer über einen längeren Zeitraum zu beobachten.

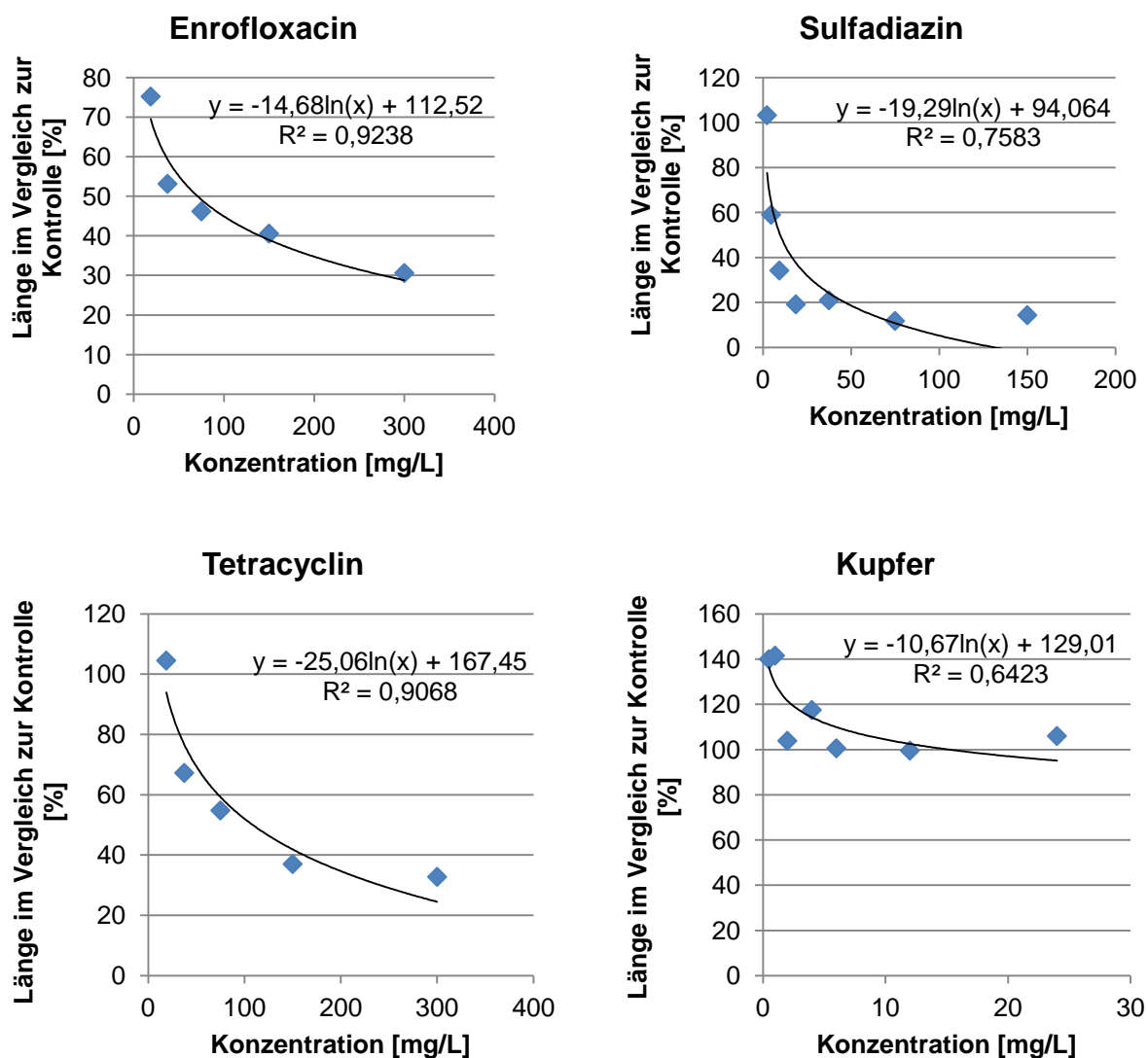


Abbildung 12: Reduktion der Wurzellänge von *Sinapis alba* im Phytotoxtest bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin, Sulfadiazin, Tetracyclin und Kupfer nach 5 Tagen

Tabelle 29: Berechnete Effektkonzentrationen der Reduktion der Wurzellänge und Reduktion der Wurzellänge von *Sinapis alba* bei 150 mg/L

Substanz	EC ₅₀ (5Tage) [mg/L]	EC ₇₀ (5Tage) [mg/L]	Reduktion der Wurzellänge bei 150 mg/L [%]
Sulfadiazin	9,8	27,7	85,6
Enrofloxacin	264,9	926,2	42,0
Tetracyclin	108,5	241,0	63,0
Kupfer*	-	-	-

*Die Berechnung des EC₅₀-Wertes bzw. EC₇₀-Wertes war für Kupfer nicht möglich

Es wurden Kombinationsversuche mit Phytotestkits durchgeführt, um zu untersuchen, ob die getesteten Stoffe in Kombination eine verstärkte Wirkung aufweisen. Da die Wirkung von Kupfer im Phytotestkit nicht bestimmt werden konnte, wurden nur die Antibiotika Sulfadiazin, Enrofloxacin und Tetracyclin in Kombination getestet. Für die Auswertung der kombinatorischen Wirkung werden üblicherweise Isobologramme erstellt (Breitinger, 2012; Tallarida, 2006). Jeder der Datenpunkte beschreibt die Stoffkonzentration des toxischen Stoffes in Reinform, oder die Konzentration beider Stoffe, bei welcher ein definierter Effekt auftritt. Für das hier gezeigte Muster-Isobologramm (Abbildung 13) wurde der EC₇₀-Wert gewählt, also die Konzentrationen bei denen einer der Stoffe alleine, oder beide in Kombination eine Wurzelreduktion um 70 % im Vergleich zur Kontrolle hervorrufen. Die beiden Datenpunkte, welche auf den beiden Achsen liegen stellen die EC₇₀-Werte der Reinsubstanzen dar, während die anderen Punkte die Konzentrationen der beiden kombinierten Substanzen darstellen, welche denselben Effekt hervorrufen. Die Datenpunkte der Einzelsubstanzen sind mit einer Linie verbunden. Verhält sich die Toxizität der beiden Stoffe rein additiv, liegen die Datenpunkte der Kombinationen auf der blauen Linie (Punkt A). Liegen die Werte unterhalb der blauen Linie, sind die Konzentrationen der beiden Substanzen in Kombination, um den gleichen Effekt zu erreichen, geringer (Punkt B1 – B3). Die Toxizität ist in diesem Fall durch die Kombination der beiden Stoffe gesteigert (synergistisch). Liegen die Datenpunkte oberhalb der blauen Linie (Punkt C), werden in Kombination größere Konzentrationen benötigt um den gleichen schädlichen Effekt hervorzurufen, die Toxizität ist geringer (subadditiv).

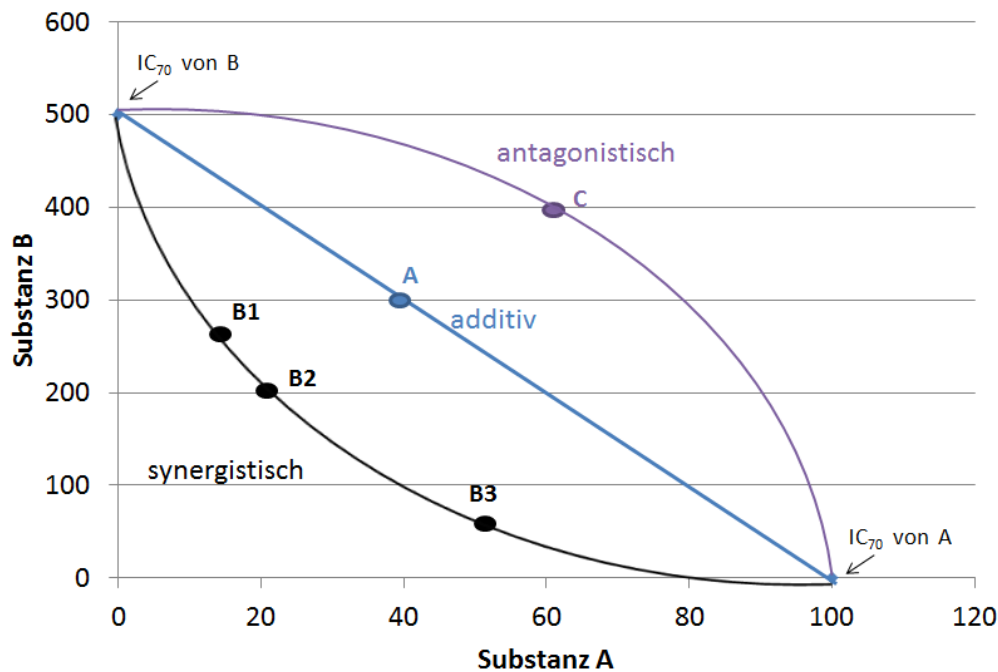


Abbildung 13: Darstellung eines Isobogramms, verändert nach Breitinger (2012)

Aus den Isobogrammen der untersuchten Antibiotika-Kombinationen (Abbildung 14) geht hervor, dass alle drei getesteten Kombinationen synergistisch wirken, ihre toxische Wirkung verstärkt sich in Kombination. Die Datenpunkte der Kombinationen liegen alle unterhalb der Linie, welche den additiven Effekt beschreibt. Die einzelnen Substanzen Sulfadiazin und Enrofloxacin riefen in den Konzentrationen 28 bzw. 926 mg/L eine Wurzelreduktion um 70 % im Vergleich zur Kontrolle hervor. In Kombination wirkten beide Antibiotika synergistisch. Es wurde berechnet, dass Konzentrationen von 0,8 und 150 mg/L oder 3 und 167 mg/L Sulfadiazin und Enrofloxacin in Kombination nötig wären, um eine Wurzelreduktion von 70 % zu erreichen, was deutlich unter den Effektkonzentrationen der Einzelsubstanzen liegt. Der synergistische Effekt zeigte sich ebenso in den Kombinationen Enrofloxacin und Tetracyclin sowie Sulfadiazin und Tetracyclin.

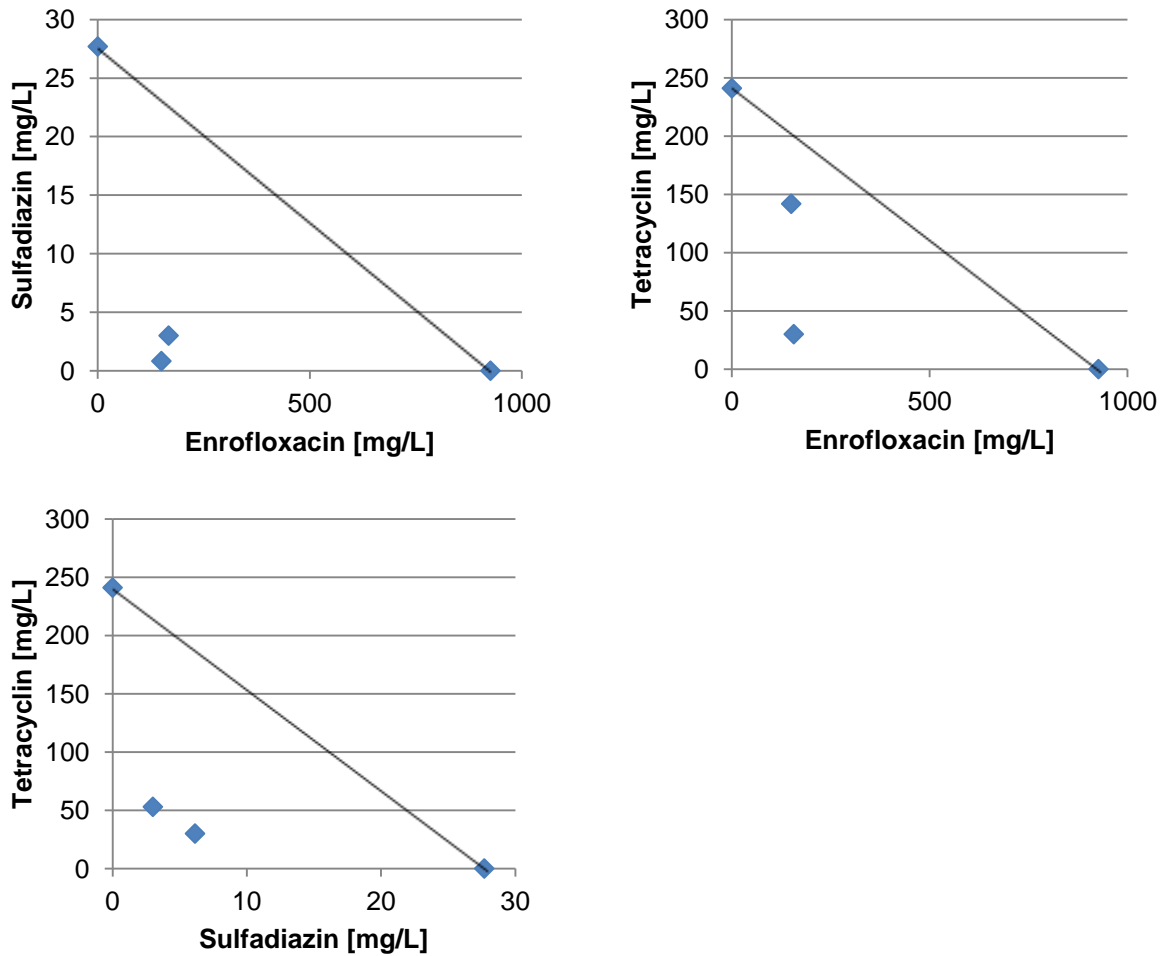


Abbildung 14: Isobologramme (EC₇₀, Inhibition des Wurzelwachstums von *Sinapis alba* nach 5 Tagen) der Kombinationen aus Enrofloxacin und Sulfadiazin, Enrofloxacin und Tetracyclin und Sulfadiazin und Tetracyclin

3.3.2 Untersuchung der Toxizität von Enrofloxacin und Kupfer in einem Hydrokulturversuch

Bei einem Hydrokulturversuch werden die Pflanzen in einer Nährlösung kultiviert, welche alle wichtigen Makro- und Mikronährstoffe enthält. Im Unterschied zu den verwendeten Phytotestkits wird der Hydrokulturversuch in einem Tag-Nacht Zyklus beleuchtet und die Wurzeln der Pflanzen haben in den Gefäßen mehr Platz, wodurch der Hydrokulturversuch eine längere Laufzeit ermöglicht. Da die Toxizität von Kupfer auf *Sinapis alba* in der 5-tägigen Laufzeit der Phytotestkits nicht hinreichend beobachtet werden konnte, wurde ein Hydrokulturversuch durchgeführt. Als Antibiotikum wurde Enrofloxacin ausgewählt, da es in den in dieser Arbeit

untersuchten Gülle- und Gärrestproben neben Tetracyclin am häufigsten detektiert wurde.

In Abbildung 15 sind die Pflanzen bei verschiedenen Kupfer- und Enrofloxacin-Konzentrationen dargestellt. Pflanzen welche Enrofloxacin ausgesetzt wurden, waren wesentlich kleiner als die Kontrollpflanzen und wiesen eine deutliche gelbe Verfärbung der Blätter auf, welche an den äußeren Rändern ins Violette überging. Diese Verfärbung wurde auch im Gefäßversuch (Kapitel 3.3.3) beobachtet. Die Wachstumsverminderung stieg mit steigender Enrofloxacin-Konzentration an, bei der höchsten Kupferkonzentration (6 mg/L) zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle kein mit bloßem Auge erkennbarer Effekt.

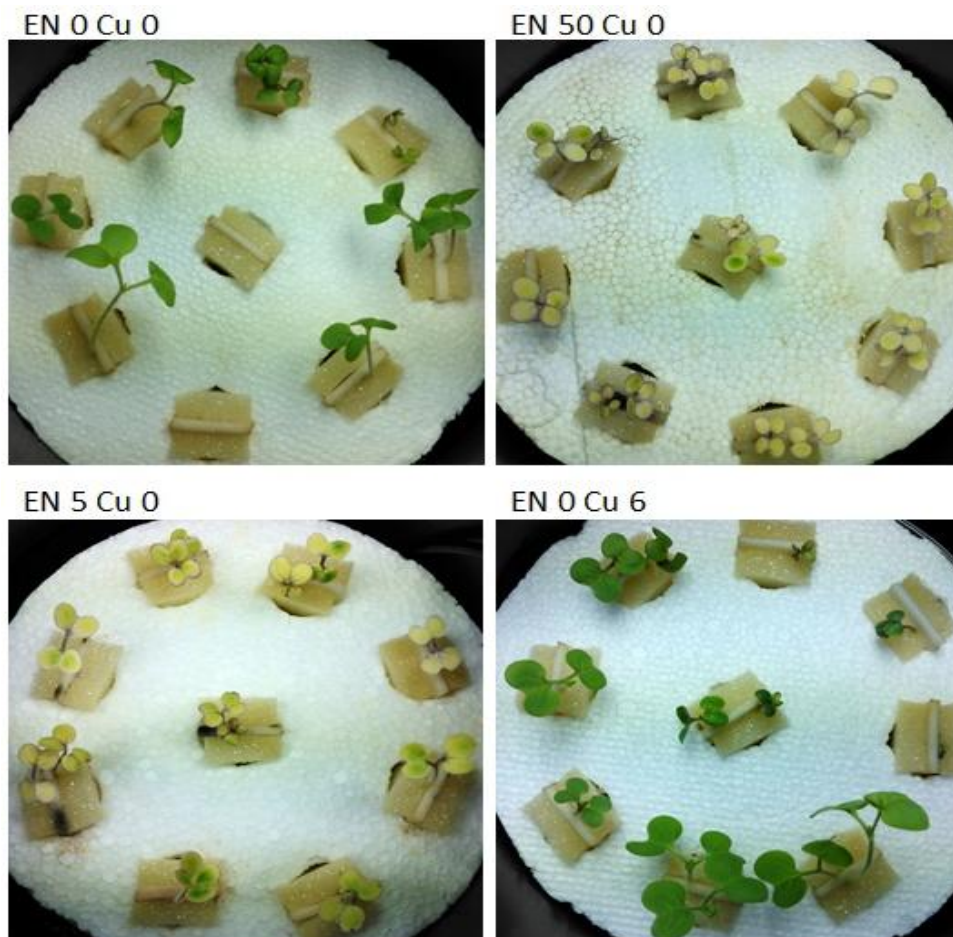


Abbildung 15: Effekte von Enrofloxacin und Kupfer auf *Sinapis alba* im Hydrokulturversuch bei verschiedenen Konzentrationen ([mg/L]; EN=Enrofloxacin, Cu=Kupfer, nach 6 Tagen)

Alle Hydrokulturgefäße welche Enrofloxacin enthielten, wiesen während der Kultivierungsphase Schimmelbefall auf, welcher derartig stark war, dass diese Töpfe nicht in der Auswertung berücksichtigt werden konnten. Die Kontrollgefäße und jene mit Kupfer blieben vom Befall verschont, was auf eine Kontamination des Enrofloxacins mit Schimmelsporen hindeuten könnte. Der Versuch die Enrofloxacinlösung durch Sterilfiltration (Porengröße 0,2 µm) keimfrei herzustellen scheiterte, da der Pilzbefall in verminderter Form wieder auftrat. Das Autoklavieren der Enrofloxacinlösung war nicht möglich, da sich Enrofloxacin durch Hitzeeinwirkung zersetzen kann.

In Abbildung 16 und Abbildung 17 ist der Effekt des Kupfers auf die Wurzellänge ersichtlich. Mit steigender Kupferkonzentration wird der Effekt auf das Wachstum der Wurzeln größer. Bei 1 mg/L wurde die Wurzellänge um 33 % reduziert, bei 3 mg/L um 49 % und in der höchsten Kupferstufe 6 mg/L um 90 %. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Frischmasse, während die Kupferstufe 1 mg/L nur eine Reduktion um 2 % aufwies, steigerte sich diese bei 3 mg/L auf 36 % und 6 mg/L auf 51 %. Der schädliche Einfluss des Kupfers war auf die Wurzellänge wesentlich größer als auf die Frischmasseentwicklung.

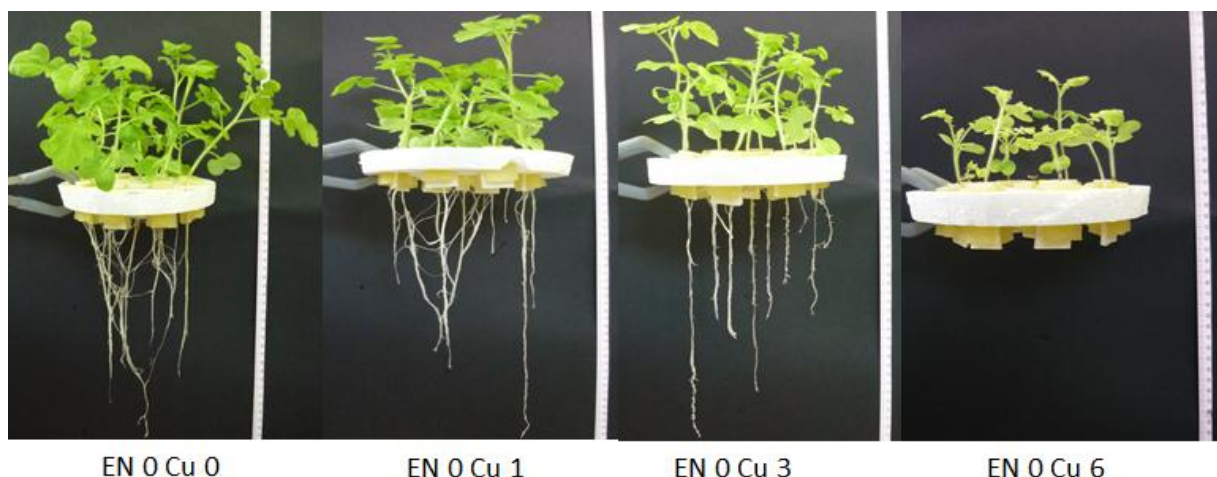


Abbildung 16: Effekt des Kupfers auf das Wurzelwachstum von *Sinapis alba* im Hydrokulturversuch ([mg/L]; links Kontrolle, Cu=Kupfer, EN=Enrofloxacin)

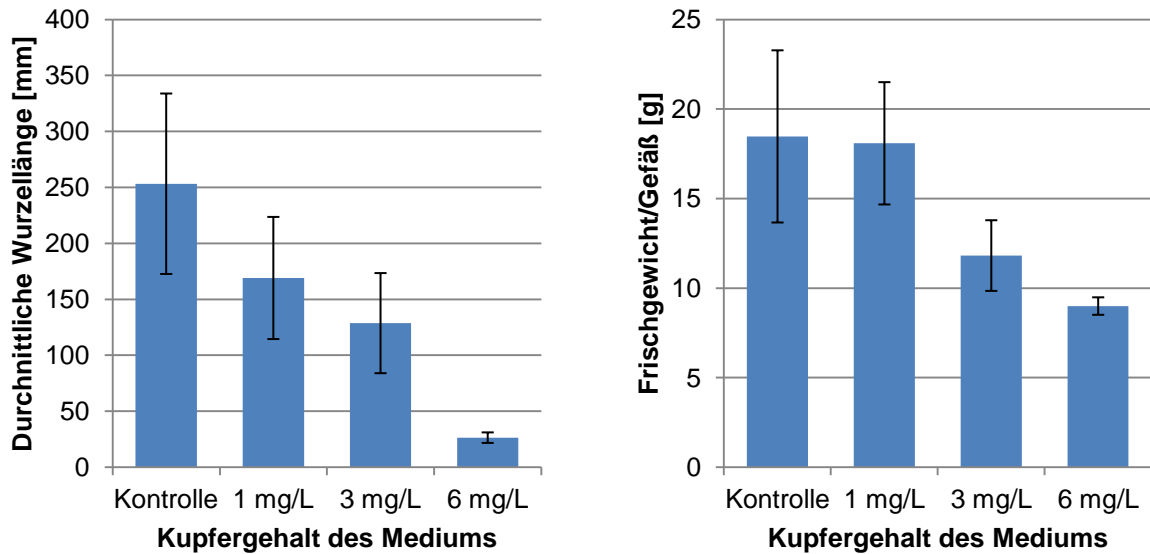


Abbildung 17: Durchschnittliche Wurzellänge und Frischgewicht pro Gefäß von *Sinapis alba* Pflanzen in Abhängigkeit von der Kupferkonzentration in Hydrokultur nach 24 Tagen

3.3.3 Gefäßversuch zur Toxikologie von Enrofloxacin und Kupfer sowie deren kombinatorischen Wirkung auf das Wachstum von *Sinapis alba*

Einige Tage nach dem Beginn des Gefäßversuchs zeigten sich die ersten Auffälligkeiten bei der Variante mit der höchsten Enrofloxacin-Konzentration. Die Pflanzen bildeten gelbliche Verfärbungen an den Keimblättern aus, welche am Rand der Blätter ins Violette übergingen, die Stiele waren ebenfalls violett verfärbt (Abbildung 18). Die nachfolgenden Blätter waren von der Verfärbung nicht betroffen. Die gleiche Verfärbung konnte auch im Hydrokulturversuch (Kapitel 3.3.2) beobachtet werden.



Abbildung 18: Einfluss von Enrofloxacin auf *Sinapis alba* nach 11 Tagen; links Kontrolle, rechts Enrofloxacin 50 mg/Gefäß

Der Einfluss von Enrofloxacin ist auf die Pflanzen in den gewählten Konzentrationen höher als der des Kupfers. Schon während des Versuchs konnte festgestellt werden, dass die Pflanzen in den Gefäßen mit niedrigen Enrofloxacinkonzentrationen von 5 mg/Gefäß teils schneller wuchsen als die Kontrollpflanzen (Tabelle 30). Dieser positive Einfluss auf das Wachstum (Hormesis) ist statistisch abgesichert nur beim Stielmaterial erkennbar (Tabelle 31). Des Weiteren sind etwas mehr Pflanzen in den Gefäßen mit Enrofloxacin gekeimt. Bei einigen Parametern wie der Blatt-Frischmasse und der Wurzel- und Blatt-Trockenmasse wurde bei Konzentrationen bis 25 mg Enrofloxacin/Gefäß kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle festgestellt. Ab einer Konzentration von 50 mg/Gefäß war das Wachstum von *Sinapis alba* deutlich verringert im Vergleich zur Kontrolle und dies zeigte sich an allen Organen. Während die Gesamt-Trockenmasse bei 25 mg/Gefäß nur um etwa 10 % reduziert war, fiel die Reduktion bei 50 mg/Gefäß mit 53,5 % wesentlich stärker aus.

Die gewählten Kupferkonzentrationen hatten nur wenig Einfluss auf das Wachstum der Pflanzen, die Konzentration von 1 mg/Gefäß hatte einen leicht positiven Effekt auf Stiel- und Blatttrockenmasse (Tabelle 30). Lediglich die Wurzel-Frischmasse war in der höchsten Kupferkonzentration signifikant geringer als in der Kontrolle, die Anzahl gekeimter Pflanzen hat sich mit steigender Kupferkonzentration wiederum erhöht (Tabelle A 5). Ein Einfluss auf die Gesamtbiomasse konnte nicht beobachtet werden.

Statistisch nachweisbare Interaktionen zwischen Kupfer und Enrofloxacin finden sich bei der Wurzel-Frischmasse, Stiel-Trockenmasse und der Anzahl der Pflanzen (Tabelle 31). Bei der Wurzel- und Stiel-Frischmasse zeigte sich bei den mittleren Konzentrationen in Kombination (Enrofloxacin 5 und 25 mg/Gefäß, Kupfer 1 und 3 mg/Gefäß) ein additiver, toxischer Effekt, welcher bei den höchsten Konzentrationen jedoch nicht mehr zu beobachten war. Bei der Mehrzahl der untersuchten Parameter fanden sich keine signifikanten Interaktionen zwischen Kupfer und Enrofloxacin.

Tabelle 30: Auswertung des Gefäßversuchs mit Enrofloxacin und Kupfer, Anzahl der Pflanzen pro Gefäß und Trockenmasse (zugehörige Frischmassen finden sich im Anhang in Tabelle A 5)

Variable	Kupferstufe [mg/Gefäß]	Enrofloxacin [mg/Gefäß]		
Durchschnittliche Pflanzenanzahl/Gefäß				
Pflanzenanzahl	0	7,81	0	8,06
	1	7,69	5	8,38
	3	8,25	25	8,00
	6	8,38	50	7,69
Trockenmasse [g/Gefäß]				
Wurzel	0	4,67	0	5,70
	1	4,60	5	5,76
	3	4,77	25	4,69
	6	4,05	50	1,93
Stiel	0	3,04	0	3,24
	1	2,61	5	3,64
	3	2,94	25	3,09
	6	2,90	50	1,52
Blatt	0	4,94	0	5,40
	1	4,34	5	5,52
	3	4,83	25	5,13
	6	5,15	50	3,22
Gesamt	0	12,9	0	14,3
	1	11,6	5	14,9
	3	12,5	25	12,9
	6	12,1	50	6,67

Tabelle 31: Statistische Auswertung des Gefäßversuchs mit Enrofloxacin und Kupfer, LSD_{5%} Test mit dem Programm Costat von Cohort

Varianzursache	Wurzel	Stiel	Blatt	Gesamt	Anzahl Pflanzen
Trockenmasse					
Kupfer	ns	*	*	ns	*
Enrofloxacin	***	***	***	***	*
Kupfer+Enrofloxacin	ns	*	ns	ns	***
Frischmasse					
Kupfer	*	ns	*	ns	
Enrofloxacin	***	***	***	***	
Kupfer+Enrofloxacin	**	ns	ns	ns	

ns: nicht signifikant, *: signifikant, **: hoch signifikant, ***: sehr hoch signifikant

Das Pflanzenmaterial wurde bei der Ernte in Blatt-, Stiel- und Wurzelmaterial aufgeteilt und die Gehalte an Enrofloxacin und Kupfer wurden analysiert. Während Kupfer in den Proben aus allen Gefäßen bestimmt wurde, wurde Enrofloxacin aus Zeit- und Kostengründen nur aus einem Gefäß jeder Variante bestimmt. Die Kupfergehalte der verschiedenen Pflanzenmaterialien finden sich im Anhang in Tabelle A 9. Die größten Mengen Kupfer fanden sich in den Wurzeln, gefolgt von den Blättern. Die geringsten Konzentrationen waren in den Stielen enthalten. Die Aufnahmearten von Kupfer lagen je nach Konzentration im Gefäß zwischen 2 und 14 % der Gesamtkupfermenge.

Bei den Enrofloxacingehalten im Pflanzenmaterial (Tabelle A 10) zeigte sich deutlich, dass Enrofloxacin in den Wurzeln angereichert wird. Die Konzentration lag häufig ein Vielfaches über der des Blatt- oder Stielmaterials. Die höchste Konzentration im Wurzelmaterial (1 mg/kg TM) fand sich in dem Gefäß der höchsten Enrofloxacinstufe (50 mg/ 7 kg Sand). Die Aufnahmearten des Enrofloxacins in die Pflanzen war relativ gering und bewegt sich um die 0,001 %, gemessen an der zugesetzten Gesamtmenge.

Um zu testen, welche Mengen an Enrofloxacin und Kupfer im Bodenwasser gelöst vorliegen, oder an den Sand adsorbiert werden, wurden Saugkerzen in Gefäßen installiert, welche keine Pflanzen enthielten.

Für die Bestimmung des gelösten Kupfers wurden alle 7 Tage Proben des Bodenwassers mit Hilfe der Saugkerzen entnommen. In Abbildung 19 sind die Anteile des gelösten Kupfers von der Gesamt-Kupfermenge in den Gefäßen (je 7 kg Sandboden) dargestellt. Der Anteil des gelösten Kupfers war abhängig von der Gesamtkonzentration, je höher die auf den Sandboden gegebene Kupferkonzentration war, desto geringer war der prozentual gelöste Anteil. Bei der geringsten Konzentration von 0,2 mg/Gefäß betrug der Anteil des gelösten Kupfers 58 – 81 %, während er bei der höchsten Konzentration (6,2 mg Cu/Gefäß) 12 – 27 % betrug. Während der Versuchszeit von einem Monat veränderte sich der gelöste Anteil des Kupfers vor allem bei der geringsten Konzentration von 0,2 mg/Gefäß. Nachdem die Konzentration im Bodenwasser in der ersten Woche konstant blieb, stieg sie nach zwei Wochen an, um dann wieder abzufallen. Bei den höher konzentrierten Gefäßen fielen die Unterschiede geringer aus, der Anteil des gelösten Kupfers wurde aber auch hier ab der zweiten Woche tendenziell geringer. Von den durchschnittlich 700 mL Bodenwasser, welche in den 7 kg Sandboden enthalten waren, wurden bei jeder Probenahme etwa 10 mL Bodenwasser und somit auch Kupfer entfernt. Dieser Verlust der Gesamtkupfermenge wurde bei der Berechnung des Anteils des gelösten Kupfers mit einberechnet (Tabelle A 11).

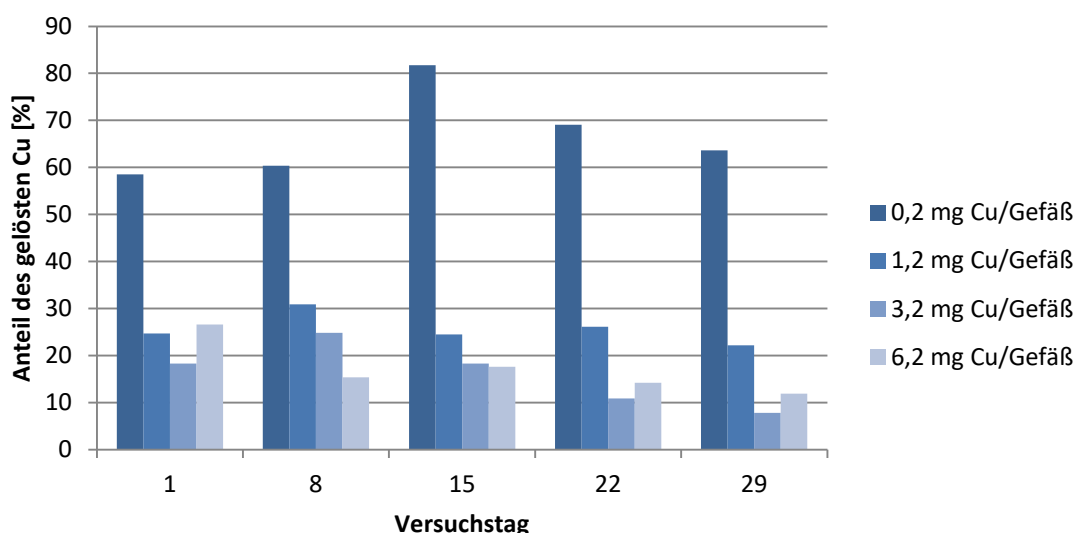


Abbildung 19: Anteil des im Bodenwasser gelösten Kupfers von der Gesamt-Kupfermenge in Gefäßen mit unterschiedlichen Konzentrationen an verschiedenen Versuchstagen

Enrofloxacin konnte nur in Bodenwasserproben nachgewiesen werden, welche 2 Tage nach der Antibiotikagabe beprobt wurden. Die Konzentrationen waren jedoch so gering, dass zwar die Nachweisgrenze, jedoch nicht die Bestimmungsgrenze erreicht wurde. Aus diesem Grund konnte keine Quantifizierung durchgeführt werden. Diese Tatsache lässt jedoch den Schluss zu, dass ein großer Teil des Enrofloxacins an dem Sandboden adsorbiert wurde und nicht frei im Bodenwasser vorlag. Da durch die Saugkerzen nur geringe Mengen Probe (2 mL) entnommen werden konnte, war eine Aufkonzentrierung der Proben nicht sinnvoll. Um zu klären ob das Enrofloxacin im Boden verblieben ist oder abgebaut wurde, wurde der Boden nach Beendigung des Versuchs mit angesäuertem Methanol extrahiert. Hierzu wurde der Boden in verschiedenen Tiefen beprobt um zu ermitteln in welchem Bereich die Adsorption erfolgt.

In Tabelle 32 sind die extrahierbaren Enrofloxacingehalte der einzelnen Bodenschichten der Saugkerzengefäße aufgeführt. Es zeigte sich, dass die größten Mengen Enrofloxacin direkt an der Oberfläche des Bodens adsorbiert wurden. In der Bodenschicht bis 4 cm Tiefe fand sich deutlich weniger Enrofloxacin als an der Oberfläche und war bei einigen Töpfen sogar nur in Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze nachweisbar. In Tiefen von 4 – 8 und 8 – 12 cm konnte kein Enrofloxacin detektiert werden. In den Extrakten der Bodenoberfläche der Konzentrationen 50 und 200 mg/Gefäß konnte zusätzlich zu Enrofloxacin Ciprofloxacin nachgewiesen werden, was ein Abbauprodukt von Enrofloxacin ist.

Es fällt auf, dass nur ein Bruchteil des ursprünglich zugesetzten Enrofloxacins durch die Messung der Bodenextrakte wiedergefunden wurde. Dies könnte darauf hindeuten, dass das Enrofloxacin während der 28-tägigen Versuchsdauer abgebaut wurde. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die durchgeführte Extraktion nicht geeignet war, um sämtliches Enrofloxacin aus dem Sandboden zu lösen.

Tabelle 32: Extrahierbare Enrofloxacingehalte in unterschiedlichen Bodenschichten der Saugkerzengefäße

Enrofloxacin (ursprünglich zugesetzt) [mg/Gefäß]	Bodentiefe [cm]	Enrofloxacin [µg/kg Boden]	Enrofloxacin [µg/Gefäß]
5	0,0 - 0,5*	0,68	4,77
	0,0 - 4,0	<LOQ	<LOQ
	4,0 - 8,0	-	-
	8,0 - 12,0	-	-
25	0,0 - 0,5*	1,36	9,51
	0,0 - 4,0	0,86	6,05
	4,0 - 8,0	-	-
	8,0 - 12,0	-	-
50	0,0 - 0,5*	3,06	21,44
	0,0 - 4,0	<LOQ	<LOQ
	4,0 - 8,0	-	-
	8,0 - 12	-	-
200	0,0 - 0,5*	29,49	206,41
	0,0 - 4,0	9,09	63,62
	4,0 - 8,0	-	-
	8,0 - 12,0	-	-

*Die oberflächliche Schicht 0,0 – 0,5 cm wurde zusätzlich zu den anderen Schichten beprobt

4 Diskussion

4.1 Aussagekraft unterschiedlicher Phosphorextraktions- und Messmethoden hinsichtlich der Bewertung des pflanzenverfügbaren Phosphorgehaltes in Wirtschaftsdüngern und Gärresten

Zwei unterschiedliche Aspekte machten es notwendig, sich im Rahmen dieser Arbeit mit methodischen Aspekten der P-Analytik auseinander zu setzen. Da die Proben eingefroren werden mussten, um einen Abbau der Antibiotika zu verhindern, war es wichtig zu testen, inwieweit diese Behandlung einen Einfluss auf die Analyse des löslichen Phosphors hat. Des Weiteren wurden mit den Gärresten Substrate auf P analysiert, wofür es keine standardisierten Messprotokolle gibt. Um zu klären, wie sich der Anteil an pflanzenverfügbarem P in allen Substraten sicher bestimmen lässt, wurden die Eingangssubstrate, Proben der Prozessschritte und Endprodukte einer Biogasanlage unterschiedlichen Probenaufarbeitungen, Extraktions- und Messmethoden unterzogen.

Um die verschiedenen Extraktionsmethoden vergleichen zu können, musste eine einheitliche Einwaage verwendet werden, da das Verhältnis von Einwaage zu Extraktionslösung einen Einfluss auf die Menge an extrahierbarem P hat (McDowell et al., 2001). Aus diesem Grund mussten die Einwaagen abweichend von den jeweiligen Vorschriften adaptiert werden.

Üblicherweise wird Phosphor aus getrockneten Proben extrahiert, da diese leichter zu handhaben und zu lagern sind. Frische Proben hingegen können nur eine begrenzte Zeit gelagert werden, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich die Proben während der Lagerung verändern. Insbesondere Gärreste weisen auch nach Verlassen des Fermenters während der Lagerung in Tanks eine mikrobielle Aktivität auf (Gioelli et al., 2011), welche zur Veränderung des Probenmaterials beitragen kann (Worsfold et al., 2005).

In der Literatur sind nur wenige Daten zur Veränderung der Löslichkeit des Phosphors durch Trocknung vorhanden. Der Einfluss verschiedener Trocknungsmethoden wie Luft-, Ofen- und Gefriertrocknung wurde bereits untersucht, jedoch nur im Hinblick auf den Gesamt-P Gehalt, wobei nur geringe Unterschiede festgestellt wurden (Akinremi et al., 2003). Der Einfluss der

Trocknungsmethode auf die Löslichkeit wurde in der Studie von Akinremi nicht untersucht.

Der Einfluss der Trocknung auf die P-Gehalte der Extrakte unterschied sich in Abhängigkeit vom Ausgangssubstrat und Extraktionsmittel. Betrachtet man die wasserlösliche P-Fraktion im Hähnchenkot, so war diese im frischen Material höher als im getrockneten (Abbildung 9, Kapitel 3.1.1). Bei den CAL-Extrakten von Hähnchenkot gab es kaum einen Unterschied zwischen getrockneter und frischer Variante, während der getrocknete Gärrest wesentlich weniger CAL-lösliches P enthielt als der frische Gärrest (Abbildung 10, Kapitel 3.1.1).

Eine Verringerung der P-Löslichkeit infolge der Trocknung deutet auf eine Umwandlung von gelösten P-Formen in schlechter lösliche Verbindungen hin. Die Kristallisation von verschiedenen Phosphorformen hängt von Faktoren wie pH-Wert, Temperatur und Ionenkonzentrationen ab (Bangert, 2005; Greaves et al., 1999; Koutsoukos et al., 1980; Newsely, 1960). Falls bei der Trocknung aus den gelösten Ionen Dicalciumphosphat (DCP) oder Tricalciumphosphat (TCP) entsteht, könnte dies eine Reduktion der Wasserlöslichkeit erklären, da diese P-Formen nur schwer in Wasser löslich sind. Neben Calciumphosphaten kann in Anwesenheit von Magnesium- und Ammoniumionen auch Struvit kristallisieren (Greaves et al., 1999). Da die Proben sehr komplex zusammengesetzt sind, ist es vermutlich nicht möglich die Kristallisationsprodukte vorherzusagen.

Im Falle des Gärrestes verhielt sich der Einfluss der Trocknung gegensächlich: hier waren die wasserlöslichen Anteile im getrockneten Material höher (Abbildung 9, Kapitel 3.1.1). Es wurde berichtet, dass wasserlöslicher, organisch-gebundener Phosphor in Schweinegülle durch Trocknen bei 105 °C in ebenfalls wasserlöslichen, anorganisch gebundenen Phosphor umgewandelt wird (Ajiboye et al., 2004). Hieraus erklärt sich jedoch nicht die beobachtete Veränderung der Wasserlöslichkeit, da diese bei Messungen per ICP beobachtet wurde, welche sowohl organische als auch anorganische P-Fractionen erfasst. Hieraus erklärt sich aber keine Veränderung der Wasserlöslichkeit. In Rindergülle wurde Carbonat-lösliches P in wasserlösliches umgewandelt (Ajiboye et al., 2004), was eine Erhöhung der Wasserlöslichkeit ergibt.

Da die Wasser-Extrakte in keiner Weise pH-gepuffert sind, konnten sich durch die Probenmatrix unterschiedliche pH-Werte in der Extraktionslösung einstellen. Der

Hähnchenkot-Extrakt (pH 6,2) wies einen sauren pH-Wert auf, während der des Gärrests basisch war (pH 10,3). Saure Bedingungen sollten dazu führen, dass schwerlösliche Phosphate wie Tricalciumphosphate, welche möglicherweise in dem getrockneten Probenmaterial vorhanden sind, in wasserlösliches Monocalciumphosphat (MCP) umgewandelt wird (Kallistratos, 1964). Dies liefert allerdings keine Erklärung für die überhöhten Werte des basischen Gärrest-Extrakts. Die Löslichkeit bestimmter eisenhaltiger Phosphorverbindungen wie Strengit und Variscit erhöht sich bei zunehmenden pH-Wert (Scheffer, 1998b). Diese Verbindungen könnten sich aufgrund des hohen Eisengehalts der Gärreste, welcher durch Zugabe von Eisensalzen während des Prozesses zustande kommt, bei der Trocknung der Proben bilden.

Das Einfrieren der Proben bietet den Vorteil, dass frische Proben längerfristig gelagert werden können. Getrocknete Proben können ebenfalls über lange Zeit problemlos gelagert werden. Die CAL-Extrakte der gefrorenen und vor der Analyse wieder aufgetauten Proben wiesen ähnliche lösliche P-Gehalte auf wie die frischen Proben, während sich bei der Wasserextraktion im Gärrest im Vergleich zur frischen Probe fast doppelt so hohe Werte ergaben (Tabelle 15, Tabelle 16, Kapitel 3.1.1). Dieser Effekt ist möglicherweise auf die Zerstörung der Zellen durch Eiskristalle und die hierdurch bedingte Freisetzung von phosphorhaltigen Bestandteilen zurückzuführen. In der Literatur wird lediglich der Effekt beschrieben, bei dem sich lösliche P-Anteile in wässrigen Proben durch einfrieren reduzieren, wenn Phosphor beim Auftauen an Calcit bindet (Gardolinski et al., 2001; Worsfold et al., 2005). Stattdessen wird die P-Analyse von Gewässerproben aus bei 4 °C gekühltem Material empfohlen, welches teilweise mit Chloroform behandelt wurde um mikrobielles Wachstum zu hemmen (Gardolinski et al., 2001). Die Chloroformzugabe sollte jedoch bei Proben mit hohem organischen Anteil vermieden werden, da sonst zelluläre Enzyme freigesetzt werden können, welche zu einer Veränderung der Probe führen können (Gardolinski et al., 2001). Literaturquellen empfehlen darüber hinaus die Kühlung von Wasser und Sedimentproben zur P-Analyse bei 4 °C und eine Analyse innerhalb von 48 Stunden aus dem Frischmaterial (McKelvie et al., 1993; Vaz et al., 1992).

Der Versuch die getrockneten Proben durch Einweichen zu konditionieren und in einen frische-ähnlichen Zustand zurückzusetzen blieb erfolglos. Während im

Wasser-Extrakt der Gärreste der P-Gehalt im Vergleich zur frischen Probe überschätzt wurde, wurde er in den CAL-Extrakten tendenziell unterschätzt (Abbildung 9, Abbildung 10, Kapitel 3.1.1). Aus diesem Grund ist das vorherige Einweichen der Proben keine geeignete Probenvorbereitungsmethode. Der Einfluss der Trocknung war abhängig von der Extraktionslösung und der Art des Probenmaterials, weshalb sich keine allgemeine Aussage darüber treffen lässt, welche Veränderungen durch die Trocknung hinsichtlich der P-Wasser-Löslichkeit hervorgerufen werden. Organische Düngemittel werden üblicherweise im frischen Zustand ausgebracht, daher sollte der verfügbare P-Gehalt im frischen Material bestimmt werden. Es muss jedoch durch schnelle Analyse und Kühlung sichergestellt sein, dass sich die Probe nicht verändert. Des Weiteren ist die Vergleichbarkeit zu Literaturwerten, welche aus getrocknetem Material analysiert werden unter Umständen nicht gegeben.

Den standardisierten Analyseverfahren liegen getrocknetes und gegebenenfalls vermahlene Probenmaterial zugrunde (Anonymous, 2003, 2008a). Die Analysen sollten jedoch auch aus dem Frischmaterial durchgeführt werden, weshalb das frische Probenmaterial mit einem Stabmixer grob zerkleinert wurde. Das Zerkleinern der Proben durch einen Mixer hatte bei frischen und gefrorenen Proben einen eher geringen Einfluss, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass der Phosphor schon teilweise in Lösung vorlag. Wesentlich größer war der Einfluss bei getrockneten Proben, bei denen die zerkleinerten Proben häufig höhere Extraktionsraten aufwiesen. Wurden die getrockneten Proben vermahlen, kam es in einigen Fällen dazu, dass die P-Löslichkeit um das bis zu zweifache überschätzt wurde (Abbildung 9, Kapitel 3.1.1). Die wasserlösliche P-Fraktion der frischen Probe ließ sich hingegen mit der getrockneten und nur grob zerkleinerten Probe vergleichen, sodass diese Probenaufbereitung für die Bestimmung der wasserlöslichen Fraktion aus dem Gärrest am ehesten zu empfehlen ist.

Eine kleinere Partikelgröße kann zu einer gesteigerten Extraktionsrate führen, wie für Kohlenstoff und Stickstoff aus Boden beschrieben (Nicolardot et al., 1992). Dieser Effekt war bei der Phosphor-Extraktion mit Wasser wesentlich größer als bei denen mit CAL (Abbildung 9, Abbildung 10, Kapitel 3.1.1). Wasser ist das schwächere Extraktionsmittel, weshalb hier eine Verkleinerung der Partikelgröße eher zum Tragen kommen könnte als bei dem stärkeren Extraktionsmittel CAL.

Da mit der Wasser-Extraktion die kurzfristig verfügbaren P-Gehalte ermittelt werden sollen (Kratz & Schnug, 2009), stellt sich die Frage wie sinnvoll das Vermahlen des Probenmaterials ist, da hierdurch auch Phosphor mit erfasst wird, welcher unter Feldbedingungen in den Teils großen Partikeln von bis zu einigen Zentimetern Kantenlänge gebunden wäre. Bei CAL-Extrakten ist dieser Effekt geringer, da das organische Material mit der Zeit abgebaut wird und CAL-Extrakte den mittelfristig verfügbaren Phosphor abbilden (Tabelle 15, Tabelle 16, Kapitel 3.1.1).

Im Hinblick auf die CAL-Extraktion ergaben sich im getrockneten, feinvermahlenden Material vergleichbare lösliche P-Gehalte zu denen in der Frischprobe, so dass hier diese Probenaufbereitung zu favorisieren ist (Abbildung 10, Kapitel 3.1.1).

Wie in Kapitel 3.1 beschrieben hing der experimentell ermittelte Phosphorgehalt stark von der Probenaufbereitung, der Messmethode und den eingesetzten Extraktionsmethoden ab.

Die CAL-Extraktionsmethode wurde zur Extraktion von pflanzenverfügbarem Phosphor in Böden entwickelt (Schüller, 1969) und wurde mindestens bis Ende der 90er Jahre für die Analyse von Komposten angewendet und fand auch in der Gärrestanalytik Anwendung (Bundesgütegemeinschaft Kompost e.V., 1998). Mittlerweile wurde die CAL-Methode auch bei Komposten durch die NAC-Extraktion ersetzt, die für Düngemittel Vorschrift ist (Anonymous, 2015d). Die NAC-Extraktion wird üblicherweise für mineralische Dünger eingesetzt, welche jedoch in der Beschaffenheit und Zusammensetzung von Gärresten abweichen. Für Gärreste existiert keine amtlich festgelegte Extraktionsmethode.

Es stellte sich die Frage, welche der vorhandenen P-Extraktionsmethoden zu präferieren ist, wie die Methodenvorschrift an das Substrat Gärrest zu adaptieren ist und ob vergleichbare Ergebnisse erzielt werden.

Die verschiedenen Extraktionsmittel sind in der Lage verschiedene P-Fractionen zu lösen. Bei der Extraktion mit Wasser gehen Monocalciumphosphat (MCP) Calciumhydrogenphosphat und Ammoniumphosphat in Lösung, wohingegen die NAC-Extraktion MCP, Dicalciumphosphat (DCP), ca. 80 % der Al-/Fe-Phosphate und basisches Ca-Phosphat (Hydroxylapatit/Tricalciumphosphat) erfasst (Kratz & Schnug, 2009). Die CAL-Extraktion ist in der Lage MCP, DCP und Ca-Phosphate zu lösen (Schüller, 1969), während der Gesamtphosphorgehalt durch einen

Königswasserwasseraufschluss nach VDLUFA bestimmt werden kann (VDLUFA, 2000a).

Welche der beiden Extraktionsmethoden (CAL oder NAC) für die Bestimmung des mittelfristig verfügbaren Phosphors in Wirtschaftsdüngern besser geeignet ist, lässt sich durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht mit Gewissheit sagen. Statistisch betrachtet unterscheiden sich die CAL- und NAC-Messwerte der getrockneten und anschließend vermahlenden Proben jedoch nicht signifikant voneinander (Tabelle 19, Kapitel 3.1.3). Im direkten Vergleich extrahierte die CAL-Methode bei Hähnchenkot mit 74 % des Gesamt-P größere Anteile als die NAC-Methode mit 49 %. Bei dem Gärrest verhielt es sich genau umgekehrt, dort wurden bei der CAL-Extraktion 87 % des Gesamt-P extrahiert und mit NAC 94 % (Tabelle 18, Kapitel 3.1.3). Im Falle des Hähnchenkots bedeutet eine Abweichung von 25 % zwischen den beiden Extraktionsmethoden, dass potentiell über oder unter dem Bedarf gedüngt wird. Welches Ergebnis den tatsächlichen löslichen P-Gehalt besser widerspiegelt müsste durch einen Gefäßversuch abgeklärt werden.

Bei der Betrachtung des Anteils der verschiedenen P-Fractionen vom Gesamt-P-Gehalt wird ersichtlich, dass der P-Wasser-Gehalt vom Vollgärrest mit 43 % unter dem der Eingangssubstrate Mais (86 %) und Hähnchenkot (59 %) lag (Tabelle 18, Kapitel 3.1.3). Andererseits stieg der Anteil der CAL- und NAC-löslichen Fraktionen während des Prozesses auf 87 % P-CAL und 94 % P-NAC an. Der Anteil an kurzfristig verfügbarem Phosphor nahm während der Prozessschritte ab, während der des mittelfristig verfügbaren P zunahm, was sich mit Literaturangaben deckt (Güngör et al., 2008).

Der analysierte Vollgärrest wies 22,1 g/kg TM Gesamt-P auf, was umgerechnet auf P_2O_5 und unter Einbeziehung der Trockenmasse (12 %) 6,1 kg P_2O_5 /t FM entspricht, was einen für Gärreste hohen Gesamt-P-Gehalt darstellt (Tabelle A 1, Anhang). Abhängig davon welches Pflanzenmaterial und welche Gülleart als Ausgangssubstrat verwendet wurde und in welchem Verhältnis diese gemischt wurden, finden sich in Gärresten auf Basis von Rinder- und Schweinegülle P_2O_5 -Gehalte von 2,1 – 3,6 kg/t FM (Kaltschmitt et al., 2009). Die Minimal- und Maximalwerte von P_2O_5 in Gärresten verschiedener Zusammensetzung liegen im Bereich 0,9 – 6,0 kg/m³, der Durchschnitt wird mit 2,3 kg/m³ angegeben (Wendland et al., 2012). Laut Möller et al. (2009) sind durchschnittliche P_2O_5 -Gehalte in

Vollgärresten 2,2, in flüssigen Gärresten 1,5 und in abgepresstem Gärresten 4,5 kg P₂O₅/t FM. Der untersuchte flüssige Gärrest (7,6 % TM) enthielt 3,2 kg P₂O₅/t FM, die feste Phase des Gärrests (32,3 % TM) 6,7 kg P₂O₅/t FM, was über den Literaturwerten liegt. Der untersuchte Hähnchenkot (65,9 % TM) hatte mit 14,2 kg P₂O₅/t ebenfalls einen hohen Wert verglichen mit dem in der Literatur erwähnten Wert von 8,6 kg P₂O₅/t FM (Kolbe, 2009).

Separation der Vollgärreste in feste und flüssige Phase hat eine Veränderung in der Nährstoffverteilung zur Folge. In der festen Phase wird Phosphor angereichert, während in der flüssigen Phase niedrige P-, und hohe K- und N-Gehalte vorliegen (Möller & Müller, 2012). Dies konnte auch bei den analysierten Proben nachgewiesen werden, allerdings nur wenn der Phosphorgehalt in der Frischmasse betrachtet wurde. Durch die geringen Trockenmassegehalte kehren sich die Ergebnisse bezogen auf Trockenmasse um (Tabelle A 1, Anhang). Daher muss für die richtige Bewertung der Ergebnisse darauf geachtet werden, ob sie sich auf Trocken- oder Frischmasse beziehen.

Der wasserlösliche Anteil des Gesamt-P in Gärresten bezogen auf Trockenmasse liegt zwischen 25 – 45 % (Möller & Müller, 2012), was sich mit dem gemessenen Wert für den Vollgärrest (43 %) deckt, die feste Phase (76 %) und flüssige Phase (52 %) des Gärrestes wiesen jedoch höhere P-Löslichkeiten auf.

Die CAL-löslichen P₂O₅-Werte von 249 Gärresten aus verschiedenen Substraten liegen bei 0,0 – 2,6 kg/t FM, der durchschnittliche Wert wird mit 1,1 kg/t FM angegeben (Haber et al., 2008), was deutlich unter dem in dieser Arbeit bestimmten Wert des Vollgärrests von 5,3 kg P₂O₅/t FM liegt (Tabelle A 1, Anhang). Für Hähnchenkot liegen keine P-CAL Werte in der Literatur vor.

Möglicherweise resultieren die höheren P-Wasser- und P-CAL-Werte aus der Tatsache, dass die meisten Biogasanlagen mit Schweine- und Rindergülle als Co-Substrat betrieben werden (Scheftelowitz et al., 2015), welche geringere P-Gehalte (Rindergülle 0,5 – 1 kg P/t, Schweinegülle 1,3 – 3,1 kg P/t) als Geflügelkot (5,7 – 10,9 kg P/t) aufweisen und somit in geringeren P-Gehalten der Gärreste resultiert (Greaves et al., 1999; Zirkler et al., 2014). Andererseits weist Geflügelkot mit 19 % geringere wasserlösliche P-Anteile auf als Gülle von Milchvieh (60%) (Kleinman et al., 2005).

Im Vergleich zu einem NPK-Mineraldünger, welcher laut Düngeverordnung einen P_2O_5 -Gehalt von mindestens 5 % aufweisen muss, lag der Phosphorgehalt des untersuchten Gärrests mit 0,6 % deutlich darunter. Dafür weisen Gärreste einen hohen Anteil an organischem Material auf, welcher wichtig für die Bodenfauna ist. Der Gehalt an löslichem Phosphor lag je nach verwendeter Extraktionsmethode zwischen 43 – 94 % und ist somit zu großen Teilen gut pflanzenverfügbar (Tabelle 18, Kapitel 3.1.3). Laut Literatur finden sich in Gärresten 12 – 19 % wasser- und 81 – 86 % NAC-lösliche P-Anteile (Waida, 2014).

Der Vergleich der kolorimetrischen P-Bestimmung mit der Bestimmung mit der ICP-OES hat deutlich gezeigt, dass die kolorimetrische Bestimmung nicht für die Analytik von Wirtschaftsdüngern geeignet ist. In den durchgeführten Extraktionen von frischen Gärrestproben wurden der P-Wasser- bis zu 31 % und der P-CAL-Gehalt bis zu 19 % im Verhältnis zu der Messung mit ICP-OES überschätzt (Tabelle A 5). Im Falle der CAL-Extraktion des frischen, zerkleinerten Gärrests lag der kolorimetrisch bestimmte Wert 17 % über dem Gesamt-P-Gehalt. Würde bei der Berechnung der benötigten Düngermenge ein überschätzter P-Gehalt zugrunde gelegt werden, würde eine niedrigere Düngermenge als vorgesehen ausgebracht werden.

Die ICP-OES-Messung sollte höhere P-Gehalte als die kolorimetrische Messung ergeben, da im Gegensatz zur kolorimetrischen Messung nicht nur anorganischer freier P, sondern zusätzlich organisch gebundener löslicher P erfasst wird, da während der Ionisierung im Plasma organische Bestandteile zersetzt werden (Matula, 2010; Nathan et al., 2002; Paz-Ferreiro et al., 2012; Pittman et al., 2005). Beim Vergleich von ICP- mit kolorimetrischen Messungen waren die ICP-Messwerte von wässrigen P-Extrakten von Bodenproben bis zu 47 % größer als die kolorimetrischen (Matula, 2010). Es ist möglich, dass der organisch gebundene Phosphor teilweise im sauren Milieu der Anfärbereagenzien freigesetzt wird (Kowalenko & Babuin, 2007; McKelvie et al., 1995), was jedoch nur für eine Annäherung von kolorimetrischem und ICP-Wert verantwortlich sein kann. Eine Überschreitung des ICP- durch den kolorimetrischen-Wert, wie er in dieser Arbeit in einigen Fällen beobachtet wurde, lässt sich dadurch nicht erklären.

Eine weitere Fehlerquelle stellen Kolloide dar, welche durch unzureichende Filtration in Extrakte gelangen können. Diese können im sauren Milieu ebenfalls Phosphor freisetzen, welcher durch das verwendete Extraktionsmittel nicht extrahiert worden

wäre. In der Literatur werden Filter mit Porengrößen von 0,45 µm (McDowell & Sharpley, 2001) empfohlen, die verwendeten Filter in der vorliegenden Arbeit hatten eine Porengröße von 5 – 8 µm, was einem feinen bis mittelporigen Filter gemäß Vorschrift entspricht. Es ist jedoch fraglich, ob der beobachtete Unterschied zwischen den Messmethoden auf diesen Effekt zurückzuführen ist, da es möglich ist, dass diese Kolloide im Plasma ebenfalls ionisiert werden. Ebenfalls bieten die Kolloide nur eine mögliche Erklärung für die höheren kolorimetrischen Werte bei Wasser- und CAL-Extrakten, nicht jedoch für das Übersteigen der Königswasser-P-Werte, da diese den Gesamtphosphorgehalt widerspiegeln.

Auch Wolf et al. (2005) stellte bei der Extraktion von Gülleproben fest, dass deren P-Gehalt durch die kolorimetrische Messung im Vergleich zur ICP-Messung um 7 % überschätzt wurde. Sie führten dies zumindest teilweise auf Messfehler durch stark gefärbte Extrakte zurück (Wolf et al., 2005). Da in der vorliegenden Arbeit ein Äquivalent von etwa 300 – 800 µL Extrakt für die Anfärbung auf 50 mL verdünnt wurde, konnte keine sichtbare Verfärbung durch den Extrakt festgestellt werden.

Eine weitere mögliche Erklärung für die Überschätzung der kolorimetrischen Werte sind gelöste Ionen wie Fe, Al, Mn, Ca, K, Mg, Na, und NO₃, welche üblicherweise in Pflanzen- und Gärrestproben enthalten sind, die die kolorimetrische Anfärbung stören können (Kowalenko & Babuin, 2007). Es wurde beobachtet, dass Eisenionen die Anfärbung behindern können, während Aluminium und Mangan diese beschleunigen. Neben Effekten einzelner Elemente wurden auch Wechselwirkungen von verschiedenen Elementen auf die Anfärbung beobachtet (Kowalenko & Babuin, 2007). Die genannten Gründe sprechen dafür, dass Extrakte aus Wirtschaftsdüngern bevorzugt mit der ICP- statt der kolorimetrischen Methode gemessen werden sollten.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Bestimmung des P-Wasser-Wertes aus frischem, unzerkleinertem Material durchgeführt werden sollte, da es dem Zustand entspricht, in welchem die Proben zur Düngung ausgebracht werden. Die Effekte, welche die Aufarbeitungsmethoden auf die P-Wasser-Werte haben, unterscheiden sich zwischen Gärrest und Hähnchenkot, sodass sich keine einheitliche Methode für beide Probenarten ableiten lässt.

Bei der CAL-Extraktion ist es alternativ zum Frischmaterial möglich getrocknetes Material zu verwenden, sofern es vermahlen ist, da sich die Ergebnisse des

Hähnchenkots und des Gärrests kaum vom frischen Material unterschieden. Getrocknete Proben sind leichter zu lagern, zu homogenisieren und zu handhaben, was sie für den Laboralltag geeigneter macht. Gefrorene Proben sind deutlich unpraktischer, da sie mehr Platz einnehmen, bei Bedarf die gesamte Probe aufgetaut werden muss und eine Veränderung der Probe durch Einfrieren und Auftauen im Vergleich zum frischen Material in einigen Fällen in dieser Arbeit beobachtet wurde. Im Falle der festen Phase des Gärrests wurden zu hohe und bei der flüssigen Phase zu niedrige Werte erfasst. Die Messung der Extrakte per ICP-OES sollte der kolorimetrischen Bestimmung vorgezogen werden, da bei dieser Methode weniger Matrixeffekte auftreten, organisch gebundener Phosphor erfasst wird und die kolorimetrische Methode in einigen Fällen zu einer Überschätzung des P-Gehaltes führte.

4.2 Bewertung der Kontamination von Wirtschaftsdüngern, Klärschlämmen und Gärresten hinsichtlich ihrer Antibiotikabelastung

Laut Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) wurden im Jahr 2014 deutschlandweit 1238 t Antibiotika an Tierärzte abgegeben, wobei auf Fluorchinolone 12,3 t, Sulfonamide 121 t und Tetracycline 342 t entfielen (Anonymous, 2015a). Große Mengen von 30 – 90 % der verabreichten Antibiotika werden unverändert ausgeschieden und finden sich in der Tiergülle wieder (Sarmah et al., 2006). Durch den Eintrag von kontaminierter Gülle in Biogasanlagen können Antibiotika auch in Gärreste gelangen (Ratsak et al., 2013; Widiasari-Mehta et al., 2016).

Es sollte bestimmt werden wie hoch die Belastung von Eingangssubstraten und Endprodukten ist und welche Belastungen sich durch die Ausbringung für die Umwelt ergeben. Durch verschiedene toxikologische Tests sollte ermittelt werden, ab welchen Konzentrationen sich Effekte auf Pflanzen und Wasserorganismen zeigen und ob diese Konzentrationen durch realitätsnahe Düngeszenarien erreicht werden können.

4.2.1 Unterschiede in der Belastung von Substraten und Gärresten mit Antibiotika

Die 43 analysierten Eingangssubstrate der Biogasanlagen enthielten zu 79 % Antibiotika, bei den Ausgangssubstraten waren es 86 %. Die Eingangs- und Ausgangssubstrate der Biogasanlagen wurden am gleichen Tag beprobt, was keine Ableitung von Abbauraten erlaubt, es lassen sich jedoch Vergleiche anstellen.

Betrachtet man die Häufigkeit der Kontamination waren die Endprodukte (Tabelle 23, Kapitel 3.2.2) häufiger belastet als die Eingangssubstrate (Tabelle 20, Kapitel 3.2.1). Eine Ausnahme davon bildete Schweinegülle, welche zu 89 % mit Antibiotika kontaminiert war, während die Gärreste, welche aus Schweinegülle hergestellt wurden nur zu 50 % kontaminiert waren. Diese Beobachtung ist möglicherweise auf den geringen Stichprobenumfang von Endprodukten zurückzuführen, welche ausschließlich Schweinegülle enthielten. Laut Literaturquellen gibt es keinen Trend dazu, dass Gärreste aus Schweinegülle weniger häufig kontaminiert sind, als Schweinegülle selbst (Ratsak et al., 2013; Widyasari-Mehta et al., 2016).

In dieser Arbeit enthielten 47 % der Eingangssubstrate und 56 % der Endprodukte, welche positiv auf Antibiotika getestet wurden, mehr als ein Antibiotikum gleichzeitig. Ein Gärrest enthielt mehr als 6 verschiedene Antibiotika (Tabelle A 7, Anhang). Eine Mehrfachkontamination von Eingangssubstraten könnte damit erklärt werden, dass diese häufig von verschiedenen Betrieben angeliefert werden und es in den Lagertanks zu einer Vermischung kommt. Eine Studie von Ratsak et al. (2013) in der insgesamt 69 Güllen und Gärreste untersucht wurden, zeigte einen Kontaminierungsgrad von 62 % in Gülle und 80 % in Gärresten. Diese Feststellungen beruht wahrscheinlich darauf, dass Biogasanlagen oft verschiedene Güllearten gleichzeitig als Substrat verwenden die im Fermenter vermischt werden. Hierdurch kann es auch zu Mehrfachkontaminationen mit verschiedenen Antibiotika kommen (Ratsak et al., 2013).

Beim Vergleich der Konzentrationen fällt auf, dass die Mediankonzentrationen von 4 der 7 detektierten Antibiotika in den Endprodukten (Tabelle 24, Kapitel 3.2.2) geringer waren als in den Eingangssubstraten (Tabelle 21, Kapitel 3.2.1). Die Mediankonzentrationen der Tetracycline und Enrofloxacin waren in den Endprodukten niedriger, während die der Sulfonamide etwas höher waren. Die

Mediankonzentrationen der Eingangssubstrate lagen im Bereich 28 – 906 µg/kg TM, welche in derselben Größenordnung liegen wie die von Ratsak et al. (2013) berichteten. Üblicherweise finden sich verschiedene Antibiotika in Eingangssubstraten und Gärresten im Mikrogramm bis niedrigen Milligramm pro kg TM Bereich (Jacobsen & Halling-Sorensen, 2006; Ratsak et al., 2013; Spielmeyer et al., 2015; Widyasari-Mehta et al., 2016).

Als Maximalkonzentrationen der einzelnen Antibiotikaklassen wurden in den Eingangssubstraten etwa 0,8 mg/kg TM Sulfadiazin, 8,6 mg/kg TM Enrofloxacin und 8,1 mg/kg TM Tetracyclin gemessen (Tabelle 22, Kapitel 3.2.1). In den Endprodukten fanden sich maximal 0,3 mg/kg TM Sulfadiazin, 2,4 mg/kg TM Enrofloxacin und bis zu 30 mg/kg TM Tetracyclin (Tabelle 25, Kapitel 3.2.2). In der Literatur sind weit höhere Maximalwerte zu finden, so wurden beispielsweise 98, 354 und 764 mg/L Tetracyclin, Oxytetracyclin und Chlortetracyclin in Gülle detektiert (Massé et al., 2014). Enrofloxacin fand sich in Konzentrationen bis 15 mg/kg in Gülle (Y. Li et al., 2013) und Sulfadiazin bis zu 6,25 mg/kg in einem Gärrest (Ratsak et al., 2013). Die in dieser Arbeit analysierten Proben sind somit in den Mediankonzentrationen mit Literaturwerten vergleichbar, Maximalkonzentrationen aus der Literatur werden nicht erreicht oder überschritten.

Die Maximalkonzentrationen waren mit Ausnahme des Tetracyclins in den Endprodukten der Vergärung geringer (Tabelle 25, Kapitel 3.2.2) als in den Eingangssubstraten (Tabelle 22, Kapitel 3.2.1). Zusammen mit der Beobachtung, dass die Mediankonzentrationen in den Endprodukten tendenziell niedriger waren, lässt sich schließen, dass ein partieller Abbau durch die anaerobe Vergärung stattfindet. Während von Ratsak et al. (2013) eine Zunahme der Mediankonzentrationen in den Gärresten beobachtet wurde, beschreibt Widyasari-Mehta et al. (2016) eine Abnahme. Da die Proben in beiden Studien am gleichen Tag genommen wurden und somit kein direkter Zusammenhang zwischen Eingangssubstraten und Endprodukten besteht, könnte die Abweichung auch zufällig sein.

Höhere Antibiotikagehalte in Gärresten könnten durch eine Aufkonzentrierung während des Fermentationsprozesses auftreten, wie sie von Nährstoffen wie Kalium, Magnesium und Calcium bekannt sind (Insam et al., 2015). Da Biomasse abgebaut wird, könnte es durch die Fermentation zu einem ähnlichen Effekt bei schwer oder

nicht abbaubaren Substanzen kommen. Dagegen spricht, dass Gülle im Fermenter mit Mais gemischt und somit verdünnt wird, wodurch die Antibiotikakonzentrationen im Gärrest generell verringert werden sollten. Des Weiteren kann ein Abbau von Antibiotika unter anaeroben Bedingungen prinzipiell stattfinden (Arikan, 2008; Spielmeier et al., 2015; Turker et al., 2013), wodurch die Konzentrationen in den Gärresten niedriger sein sollten.

Die in dieser Arbeit untersuchten Gärreste zeigten tendenziell geringere Median- und Maximalkonzentrationen an, als die Eingangssubstrate. Eine komplette Eliminierung der Antibiotika durch die anaerobe Vergärung ist nicht möglich, da Antibiotika welche sich in Gülle befinden auch in Gärresten detektiert werden können (Widyasari-Mehta et al., 2016). Der effektivste Ansatz um die Kontamination von Wirtschaftsdüngern zu verringern ist den Einsatz von Antibiotika zu verringern.

4.2.2 Bedeutung der Antibiotikabelastung von Substraten und Gärresten hinsichtlich der Antibiotikafrachten, die aus der landwirtschaftlichen Verwertung resultieren

In den untersuchten organischen Düngern wurde eine Vielzahl von Antibiotika in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen. Durch die Düngung mit kontaminierten Substraten können die Antibiotika auf Ackerflächen gelangen, wo sie mit dem Boden, Bodenorganismen und Pflanzen in Interaktion treten können. In diesem Kapitel wird beschrieben welche Antibiotikafrachten durch die Düngung mit stark kontaminierten Substraten zu erwarten sind und diese werden hinsichtlich ihres Risikopotentials beurteilt.

Anhand der ermittelten Antibiotika-Maximalkonzentrationen (Kapitel 3.2.1, 3.2.2) wurden die durch die Düngung ausgebrachten Antibiotikafrachten in einem Worst-Case-Szenario berechnet. Dabei wurde die Applikationsmenge anhand der maximalen Ausbringungsmenge für Stickstoff (N) kalkuliert. Laut Düngeverordnung (§4 III 1 DüV) dürfen maximal 170 kg N/ha·Jahr durch Wirtschaftsdünger ausgebracht werden. Die Klärschlammverordnung limitiert die Aufbringungsmenge von Klärschlamm-Trockenmasse auf 5 Tonnen je Hektar in 3 Jahren, was einer Menge von 1,7 t TM pro Jahr entspricht (§6 I AbfKlärV). Die Stickstoffgehalte können

aus gefriergetrockneten Proben nicht exakt bestimmt werden, da während der Gefriertrocknung Stickstoffverluste in Form von Ammoniak auftreten. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Kalkulationen auf Stickstoffgehalte aus der Literatur zurückgegriffen, anhand derer die maximal zulässige Ausbringungsmenge an organischem Dünger berechnet wurde (Tabelle 33).

Tabelle 33: Maximal zulässige, jährliche Düngemengen für verschiedene Wirtschaftsdünger und Klärschlamm, berechnet anhand von Nährstoffgehalten aus Literaturquellen, für eine Düngung von 170 kg N/ha-Jahr

Art des Düngers	Gesamt N [kg/t FM]	TM [%]	Zulässige Düngemenge [t FM] bei 170 kg N/ha-Jahr
Geflügelkot	15,5	43,0	11,0
Schweinegülle	7,8	28,0	21,7
Rindergülle	5,1	22,0	33,6
Vollgärrest	6,1	10,1	27,9
Gärrest (flüssige Phase)	5,1	6,6	33,3
Gärrest (feste Phase)	6,5	21,8	26,2
Klärschlamm	3,9*	6,1	1,7 (23,9**)

*berechnet aus 64 kg N/t TM auf Basis von 6,1 % TM **gesetzliche Ausbringungsmenge (5 t TM/ ha·3 Jahre) richtet sich nicht nach N-Gehalt, Ausbringungsmenge bezogen auf 170 kg N/ha-Jahr; Quellen: (Möller et al., 2009), (Paulsen et al., 2011)

Anhand der berechneten Applikationsmengen in Tabelle 33 wurde im Folgenden der daraus resultierende Antibiotika-Eintrag in den Boden berechnet. Für die Berechnung wird eine Bodendichte von 1,5 t/m³ und eine Tiefe von 0,3 m zugrunde gelegt, woraus eine Bodenmasse von 450 kg/m² resultiert (Tabelle 34). Derzeit dürfen in Deutschland laut Düngeverordnung jährlich noch 170 kg/ha N durch Wirtschaftsdünger ausgebracht werden, weshalb die Antibiotikafrachten basierend auf diesem Wert berechnet wurden. In anderen Ländern wie z.B. Schweden werden Wirtschaftsdünger basierend auf ihrem P-Gehalt ausgebracht, wobei eine maximale P-Applikation von 22 kg/ha P erlaubt sind. Diese Phosphor-Menge wird als mittlerer P-Entzug durch Ernte angesehen (Haneklaus et al., 2016). Basierend auf dieser P-Applikationsmenge würden sich für Geflügelkot, Schweinegülle, Vollgärrest und die feste Phase des Gärrests um 11 – 57 % geringere Antibiotikafrachten ergeben als in Tabelle 34 berechnet. Für die flüssige Phase des Gärrests ergäbe sich keine Änderung, während die Frachten für Rindergülle sogar um 26 % größer wären.

Tabelle 34: Antibiotikafrachten, die sich aus den zulässigen jährlichen Düngemengen von Wirtschaftsdüngern und Klärschlamm (Tab. 33) ergeben (es wurden die maximalen in dieser Arbeit bestimmten Antibiotikagehalte in Probenmaterialien zugrunde gelegt, Trockenmassen entsprechen denen der Proben)

Substanz	c_{\max} [$\mu\text{g}/\text{kg}$]		TM [%]	c_{Matrix} [mg/t]		Fracht [$\text{mg}/\text{ha}\cdot\text{Jahr}$]	c_{Boden} [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
	TM]	Matrix		FM]			
SD	787	Klärschlamm (Eingang)	0,1	0,8	1,3	<0,01	
SM	117	Gärrest (flüssig)	10,1	11,9	396,0	0,09	
CP	1969	Klärschlamm (Eingang)	7,1	140,2	232,7	0,05	
EN	8626	Hähnchenkot	60,7	5232,3	57460,3	12,77	
TC	29758	Gärrest (flüssig)	10,1	3011,5	100382,0	22,31	
OTC	7781	Schweinegülle	3,1	242,0	5247,0	1,17	
CTC	843	Rinder/Schweinegülle*	6,4	54,2	1497,6	0,33	

*Mittelwert der Düngemenge aus Rinder- und Schweinegülle zur Berechnung zugrunde gelegt; c_{\max} : Maximalkonzentration des Antibiotikums in den analysierten Proben; TM: Trockenmasse; c_{Matrix} : Konzentration in der Frischmasse der Matrix; c_{Boden} : Konzentration im Boden, SD: Sulfadiazin, SM: Sulfamethazin, CP: Ciprofloxacin, EN: Enrofloxacin, DF: Difloxacin, TC: Tetracyclin, OTC: Oxytetracyclin, CTC, Chlortetracyclin

Die berechneten Frachten liegen im Bereich weniger Mikrogramm pro kg Boden, was sich mit den ebenfalls berechneten Werten von Ratsak et al. (2013) deckt. Die von Boxall et al. (2006) kalkulierten Frachten liegen etwas über diesen Werten, für die meisten Antibiotika wurden Frachten von <100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Boden berechnet, für Enrofloxacin jedoch >300 und für Trimethoprim >1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Boden.

In Böden wurden allerdings auch höhere Antibiotikagehalte von 1 – 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Sulfonamiden, 6 – 52 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Fluorchinolonen und 39 – 900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Tetracyclinen analytisch nachgewiesen (Kemper et al., 2008). Enrofloxacin wurde aufgrund seiner starken Sorption an die Bodenmatrix häufig nur in den oberen Bodenschichten nachgewiesen. In Tiefen von 0 – 5 cm konnten 23 – 51 μg und in 10 – 15 cm 10 – 29 μg Enrofloxacin/kg Boden detektiert werden (Sturini et al., 2012). Norfloxacin und Ciprofloxacin wurden in kontaminierten Böden in Konzentrationen von 6,2 – 9,8 mg/kg bzw. 3 – 5,8 mg/kg festgestellt (Morales-Muñoz et al., 2004), was die höchste in der Literatur beschriebene Belastung eines realen Bodens darstellt. Die berechnete Fracht für Enrofloxacin, welches der gleichen Antibiotikaklasse angehört, liegt mit 13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Boden um etwa das 500-fache unter den in der Literatur

beschriebenen Bodengehalten. Tetracycline wurden im Boden in Spitzenkonzentrationen von 300 – 1700 µg/kg Boden detektiert (Hamscher et al., 2005; Kay et al., 2004), was ebenfalls die hier berechnete Fracht um fast das 80-fache übersteigt. Die Frachten in dieser Arbeit wurden als Worst-Case-Szenario anhand der real bestimmten Gehalte berechnet. Die vergleichsweise geringen, berechneten Frachten legen den Schluss nahe, dass es weitaus höher kontaminierte Substrate gibt, als die in dieser Studie untersuchten (Literatur Höchstwerte siehe Kapitel 4.2.1).

Ein weiterer Erklärungsansatz für die im Vergleich zu den in dieser Arbeit berechneten Frachten höheren Literaturwerte könnte die Akkumulation von Antibiotika in Böden sein. Eine Anreicherung im Boden erfolgt, wenn durch wiederholtes Düngen mehr Antibiotika zugeführt als abgebaut oder durch Pflanzenaufnahme und Auswaschung abgeführt werden. Antibiotika können zum Teil noch lange Zeit nach der Düngung im Boden nachgewiesen werden. In einer Studie in der kontaminierte Schweinegülle auf den Boden ausgebracht wurde, konnte nach 7 Monaten ein Sulfadimidingehalt im Boden von 15 µg/kg Boden detektiert werden (Christian et al., 2003). Laut Analyse der verwendeten Schweinegülle und einer angenommenen Eindringtiefe von 30 cm hätte sich ein Wert von 13 µg/kg Boden ergeben können, woraus sich eine hohe Persistenz von Sulfadimidin im Boden ableiten lässt (Christian et al., 2003). Da von Sittig et al. (2014) Abbauraten von 80 – 90 % für Sulfadiazin beschrieben wurden, scheinen die Abbauraten stark von den jeweiligen Versuchs- und Feldbedingungen abzuhängen. Der Abbau von Chlortetracyclin in mit Rindergülle gedüngtem Boden ist temperaturabhängig, die Abbauraten schwanken je nach Temperatur zwischen 0 % (4 °C) und 56 % (30 °C) (Gavalchin & Katz, 1994). Der Abbau von Enrofloxacin in sandigem Lehmboden beträgt nach 56 Tagen 30 % (Thiele-Bruhn, 2003). Andere Literaturquellen berichten von wesentlich geringeren Abbauraten, bei denen Tetracycline nach 30 bzw. 180 Tagen gar nicht abgebaut wurden (Sarmah et al., 2006; Thiele-Bruhn, 2003).

Antibiotika, welche löslich sind, können durch Mikroorganismen im Boden abgebaut werden, es ist jedoch fraglich inwieweit sich stark gebundene Substanzen dem Abbau entziehen (Massé et al., 2014). Selbst Sulfadiazin, welches eine vergleichsweise schwache Wechselwirkung mit dem Boden aufweist, bildet bis zu 64 % nichtextrahierbare Rückstände im Boden aus (Kreuzig et al., 2005).

Die Konzentration von Antibiotika im Boden kann neben dem Abbau auch durch Auswaschung reduziert werden. Entscheidend hierfür ist die Stärke der Adsorption an den Boden. Verglichen mit Sulfadiazin weisen Tetracyclin und Enrofloxacin sehr hohe Verteilungskoeffizienten im Boden auf, was ihre starke Bindung im Boden bedingt (Sarmah et al., 2006; Thiele-Bruhn, 2003). Die Adsorption von Antibiotika im Boden beruht neben der Komplexierung auf hydrophoben und ionischen Wechselwirkungen (Massé et al., 2014). Besonders Sulfonamide sind im Boden mobil und können durch Regenfälle leicht ausgewaschen werden (Hamscher et al., 2005).

Einer Langzeitstudie zufolge (Hamscher et al., 2005), bei der ein überwiegend sandiger Boden über 3 Jahre mehrfach mit kontaminierter Gülle gedüngt wurde, fand sich im Boden eine durchschnittliche Tetracyclin-Konzentration von 150 µg/kg, eine Akkumulierung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Eine Auswaschung von Tetracyclin in tiefere Bodenschichten oder Grundwasser konnte ausgeschlossen werden (Hamscher et al., 2005). Auch wenn die Studie von Hamscher et al. eine Akkumulation im Boden nicht belegen konnte, ist es denkbar, dass es unter bestimmten Bedingungen, bei denen die Abbauraten durch niedrige Temperaturen oder starke Adsorption an den Boden gering sind, zu einer Antibiotika-Akkumulation im Boden kommen kann. Ein weiteres Indiz für eine Antibiotika-Akkumulation im Boden ist die Tatsache, dass in vielen Studien Antibiotikakonzentrationen im Boden ermittelt wurden, welche deutlich über den in dieser Studie oder von Ratsak et al. (2013) berechneten Frachten lagen.

4.3 Toxikologie und kombinatorische Effekte von Antibiotikarückständen und Schwermetallen auf Flora und Fauna

Allein die Tatsache, dass in vielen Substraten und Gärresten Antibiotika detektiert werden konnten, gibt noch keinen Hinweis auf die ökologische Relevanz der gefundenen Konzentrationen. Im Hinblick auf Antibiotika sind hierbei zwei Aspekte von Bedeutung, zum einen ihr Einfluss auf eine mögliche Resistenzbildung im Boden, die in dieser Arbeit nicht betrachtet wurde, und zum anderen deren direkte Toxizität auf Wasserorganismen und Pflanzen. Über Toxkits können nur

Erkenntnisse über die akute Toxizität einzelner Stoffe gewonnen werden, aufgrund ihrer kurzen Laufzeit werden Langzeiteffekte nicht erfasst. In Toxkits wird häufig mit wässrigen Medien gearbeitet, in denen die zu testenden Stoffe oft nicht löslich sind. Generell ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Toxkits auf Feldbedingungen nur eingeschränkt möglich, da Toxkits durch ihren einfachen Aufbau wichtige Interaktionen in der Umwelt nicht abbilden. Aufgrund dieser Einschränkungen ist es fraglich ob kombinatorische Effekte immer realistisch erfasst werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, inwieweit kommerziell verfügbare Toxkits geeignet sind, die direkte Toxikologie von Antibiotikawirkstoffen sowie kombinatorische Effekte abzubilden, was für Pflanzen über begleitende Gefäßversuche verifiziert wurde.

4.3.1 Eignung von Toxkits für die Beurteilung der toxikologischen Wirkung von Antibiotika und Schwermetallen sowie möglicher kombinatorischer Effekte

Sogenannte Toxkits sind Schnelltests für die Bestimmung der Toxizität eines Stoffes auf einen Modellorganismus. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie meist einfach zu handhaben und schnell durchzuführen sind und viele verschiedene Substanzen unter definierten Bedingungen getestet werden können. Wenn toxische Eigenschaften mithilfe eines dieser Schnelltests zu beobachten sind, besteht die Möglichkeit, dass toxische Effekte auch in der Umwelt beobachtet werden können, sofern die real auftretenden Konzentrationen ähnlich sind.

Wenn Antibiotika über Wirtschaftsdünger, Klärschlämme oder Gärreste auf den Acker gelangen, können diese Bodenorganismen beeinträchtigen, direkt Einfluss auf das Pflanzenwachstum nehmen oder, wenn ein Austrag in Gewässer stattfindet, auch Wasserorganismen beeinflussen. Da die Toxkits in wässrigem Medium durchgeführt werden, ist die Übertragbarkeit auf Wasserorganismen vermutlich eher gegeben als auf Bodenorganismen oder Pflanzen, da in diesem Fall die Verfügbarkeit der Stoffe durch die Bodenmatrix verändert wird. Im Falle der Pflanzen kommt erschwerend hinzu, dass durch die Toxkits nur der Einfluss auf die Keimung erfasst wird, nicht aber auf das weitere Wachstum. Vergleichend wurden Untersuchungen an dem Wasserorganismus *Daphnia magna* und zur Keimung von

Sinapis alba durchgeführt, um die Eignung der Toxkits für die Beurteilung der Toxizität verschiedener Antibiotikawirkstoffe auf unterschiedliche Zeigerorganismen zu erfassen.

Toxizitätstests mit *Daphnia magna*

Als problematisch bei der Durchführung der Daphnien Toxkits stellte sich heraus, dass einige der zu testenden Substanzen in der standardisierten Kulturlösung nicht löslich waren oder mit Bestandteilen präzipitierten (Kapitel 3.1.1). Für das Phytotestkit mit *Sinapis alba* sollten die Analyten in destilliertem Wasser gelöst werden, was jedoch nicht in allen Fällen möglich war, da Enrofloxacin unter neutralen Bedingungen nicht löslich ist. Diese Beispiele zeigen die Grenzen der Anwendbarkeit der Toxkits, es kann nicht jede beliebige Substanz mit diesen getestet werden. Während bei den Toxkits mit *Sinapis alba* eine Pufferlösung eingesetzt werden konnte, um die Löslichkeit aller Testsubstanzen zu ermöglichen und einen konstanten pH-Wert sicherzustellen, konnte der pH-Wert bei den Daphnien Toxkits nicht beliebig verändert werden, da die Daphnien einen pH-Wert zwischen 6 und 9 im Nährmedium benötigen (Anonymous, 2008b).

Der mittels des Daphnien-Toxkits bestimmte EC_{50} -Wert für die Immobilisierung nach 48 Stunden von 15,5 mg/L Enrofloxacin (Tabelle 28, Kapitel 3.3.1) deckt sich mit dem Wert von 16 mg/L von Dalla Bona et al. (2015). Der ermittelte Wert für Sulfadiazin ist mit 10,6 mg/L jedoch deutlich unter dem Literatur- EC_{50} -Wert von 211 mg/L (Dalla Bona et al., 2015). Die ermittelten Werte liegen weit über dem Nano- bis Mikrogramm pro Liter Bereich, welcher in Gewässern zu erwarten ist (Costanzo et al., 2005; Kay et al., 2005; Kemper et al., 2008). Der Effekt der Immobilisierung von Individuen durch die direkte Einwirkung von Antibiotika in der Umwelt ist daher unwahrscheinlich. Bezüglich der Kombinationstoxikologie von verschiedenen Antibiotika auf *Daphnia magna* wurden nur sub-additive Effekte beobachtet (Dalla Bona et al., 2015).

Für Schwermetalle sind EC_{50} -Werte von 16 mg Fe^{3+} /L, 0,022 mg Cu^{2+} /L und 5,5 mg Zn^{2+} /L für *Daphnia magna* beschrieben (Sorvari & Sillanpää, 1996). Der in dieser Arbeit bestimmte Wert von Kupfer liegt mit 0,11 mg/L in derselben Größenordnung (Tabelle 28, Kapitel 3.3.1), jedoch ist der Wert für Zink mit 3,89 μ g/L deutlich geringer als die Literaturangabe. In Gewässern findet sich Kupfer

üblicherweise in Konzentrationen von wenigen µg/L (Phillips, 1977), sodass nur in stärker belasteten Gewässern das Potential einer Schädigung von Wasserorganismen durch Schwermetalle besteht.

Toxizitätstests mit *Sinapis alba*

Bei der Durchführung der Phytotestkits wurde die toxikologische Wirkung verschiedener Antibiotikawirkstoffklassen auf *Sinapis alba* getestet. Für Sulfadiazin wurde in dieser Arbeit ein $EC_{50-120Std}$ -Wert für die Inhibition des Wurzelwachstums von 9,8 mg/L bestimmt (Tabelle 29, Kapitel 3.3.1). Ein Effekt in ähnlicher Größenordnung wurde von Sulfamethazin und Sulfadimethoxin verursacht, nach 8 Tagen wurde bei einer Konzentration von 11,5 mg/L in der Nährlösung eine Inhibition des Wurzelwachstums von Gerste um 24 bzw. 51 % beobachtet (Michelini et al., 2013). Bei Studien, welche in Boden durchgeführt wurden, traten die toxischen Effekte verzögert ein. Bei einer Konzentration von 10 mg/kg Boden Sulfadiazin zeigten *Salix fragilis* und *Zea mays* nach 40 Tagen Wachstum ein stärkeres Wurzelwachstum, während bei 200 mg/kg die Wurzellänge um 38 % bzw. 84 % reduziert war. Des Weiteren zeigten sich bei den hohen Konzentrationen morphologische Auffälligkeiten (Michelini et al., 2012). Eine Studie welche Reis als Testpflanze verwendete, konnte nach 20 Tagen eine 50 %ige Wurzelinhibition durch Sulfamethoxazol und Sulfamethazin bei 13 und 43 mg/kg Boden festgestellt werden (Liu et al., 2009). Die abgeschwächte akute Toxizität, beziehungsweise das spätere Eintreten der toxischen Effekte, ist möglicherweise auf irreversible Adsorptionsvorgänge im Boden zurückzuführen, wie sie von Kreuzig et al. (2005) beschrieben wurden. Gebundenes Sulfadiazin wäre somit nicht mehr direkt bioverfügbar.

Die im Wasser wachsende Grünalge *Selenastrum capricornutum* wies nach 3 Tagen eine 50 %ige Wachstumsinhibition durch Sulfonamide bei Konzentrationen von 1,5 – 2,3 mg/L auf (Eguchi et al., 2004). Dies zeigt, dass von Ackerflächen ausgewaschene Sulfonamide Gewässerorganismen schaden können. Innerhalb der Gruppe der Algen können die Effektkonzentrationen unterschiedlich ausfallen, *Chlorella vulgaris* wies mit einem EC_{50} -Wert von 11,2 mg/L Sulfadimethoxin eine höhere Toleranz auf (Eguchi et al., 2004), was deutlich macht, dass toxische Effekte auf verschiedene Organismen unterschiedlich ausgeprägt sein können.

Migliore et al. (2003) untersuchten die Toxizität von Enrofloxacin auf verschiedene Nutzpflanzen in einem Nährmedium. Bei geringen Konzentrationen von 50 µg/L zeigten sich teilweise hormetische Effekte, bei denen das Pflanzenwachstum gefördert wurde. Bei 100 µg/L zeigten sich je nach Pflanzenart und betrachtetem Parameter sowohl negative Effekte als auch hormetische Effekte. Bei einer Konzentration von 5000 µg/L zeigten sich durchgehend negative Effekte auf das Pflanzenwachstum. Die Länge der Primärwurzel von *Cucumis sativus*, *Lactuca sativa* und *Raphanus sativus* war nach 10 bzw. 30 Tagen um etwa 50 bis 80 % reduziert (Migliore et al., 2003). Im Phytotestkit mit *Sinapis alba* wurde eine 50 %ige Reduktion des Wurzelwachstums nach 5 Tagen bei 265 mg/L beobachtet (Tabelle 29, Kapitel 3.3.1), was eine weit höhere Konzentration darstellt als die von Migliore beschriebene.

Für Tetracyclin wurde ein EC₅₀-Wert für die Keimung von *Sinapis alba* nach 120 Stunden von 108,5 mg/L im Phytotestkit ermittelt (Tabelle 29, Kapitel 3.3.1). Für das strukturell ähnlich aufgebaute Oxytetracyclin ist ein EC_{50-96Std}-Wert von 9 mg/L bekannt, welcher jedoch für Gurke statt Senf bestimmt wurde (Norman, 1955). Bei Alfalfa wurde eine Wurzelinhibition von 85 % bei einer Oxytetracyclin-Konzentration von >0,9 mg/L nach 10 Tagen beobachtet, die Samen wurden im Unterschied zu den Toxkits vorher gekeimt und erst anschließend in die Hydrokultur eingesetzt (Kong et al., 2007). Für Tetracyclin selbst sind nur Studien zur Toxizität bekannt, welche in Böden durchgeführt wurden. Bei 0,5 mg/kg Tetracyclin im Boden wurde keine Veränderung des Wachstums von *Phaseolus vulgaris* festgestellt (Badea et al., 2013), bei einer Oxytetracyclin-Konzentration von 1 mg/kg Boden war das Pflanzenwachstum von Karotten und Salat nach 103 bzw. 152 Tagen signifikant reduziert (Boxall et al., 2006).

Die im Phytotestkit bestimmte EC₅₀-Konzentration (Tabelle 29, Kapitel 3.3.1) von Sulfadiazin für *Sinapis alba* bewegt sich in der gleichen Größenordnung wie die Literaturwerte. Die in dieser Arbeit bestimmten EC₅₀-Konzentrationen von Enrofloxacin und Tetracyclin sind größer als die Literaturwerte. Keine der Vergleichsstudien nutzte *Sinapis alba* als Testpflanze, unterschiedliche Pflanzenarten können jedoch erhebliche Unterschiede in ihrer Reaktion auf Antibiotika aufweisen. Die EC₅₀-Werte für die Keimhemmung durch Tetracyclin sind für Gurken drei- bis viermal höher als für Hafer und Reis (Liu et al., 2009). Des

Weiteren könnte die kürzere Laufzeit der Phytotestkits in höheren Effektkonzentrationen resultieren. Je länger die Laufzeit ist, desto eher können auch niedrige Konzentrationen Schäden verursachen. Von Schwermetallen ist bekannt, dass sie die Keimung weniger empfindlich stören als das Wachstum des Keimlings selbst (W. Li et al., 2005).

Die verwendeten Phytotestkits waren nicht geeignet die Toxizität von Kupfer zu bestimmen, da sich auch in hohen Konzentrationen von 24 mg/L nach 5 Tagen noch keine Effekte einstellten (Tabelle 29, Kapitel 3.3.1). Untersuchungen mit verschiedenen Pflanzenarten zeigten, dass bei Keimung und Wachstum in einer Kupferlösung von 5 mg/L das Wurzellängenwachstum nach 13 Tagen um 25 – 59 % vermindert war (Ouzounidou, 1995). Da die im Versuch eingesetzten Kupferkonzentrationen also durchaus hoch genug waren das Wurzelwachstum zu beeinträchtigen wurde daraus geschlossen, dass die Zeitspanne über die die Phytotestkits liefern zu kurz ist um Schädigungen hervorzurufen. Laut Literatur zeigten Wurzeln von *Sinapis alba* in Hydrokultur bei einer Konzentration von 1,1 mg/L nach 8 Tagen, bzw. bei 2 mg/L nach 72 Stunden eine 50 %ige Reduktion des Wurzelwachstums (Fargašová, 2001, 2004). Fargašová ließ die Samen im Unterschied zu den Phytotestkits vor dem Versuch keimen, weswegen nach 72 Stunden ein Effekt beobachtet werden konnte (Fargašová, 2001, 2004). Im anschließend durchgeführten Hydrokulturversuch konnte gezeigt werden, dass bei Keimung im mit Kupfer kontaminierten Nährmedium nach 24 Tagen eine signifikante Reduzierung des Wurzelwachstums durch Kupfer festzustellen war (Abbildung 17, Kapitel 3.3.2).

Möglicherweise ist die Toxizität von Kupfer auf die Keimung und die Frühphase des Wachstums nur gering, sodass in den Phytotestkits keine Beeinträchtigung sichtbar wurde. Die Laufzeit der Phytotestkits zu verlängern oder bereits vorgekeimte Samen einzusetzen wäre nicht sinnvoll, da in den Phytotestkits keine Nährstofflösung eingesetzt wird, die Kunststoffhüllen relativ klein sind und die Wurzeln bei längerer Laufzeit nicht genügend Platz zum Wachsen haben. Sollen längere Zeiträume betrachtet werden, so muss ein anderer Versuchsansatz gewählt werden.

Kombinationstoxikologie

In vielen der analysierten Wirtschaftsdünger und Klärschlämme wurden mehrere Antibiotika gleichzeitig detektiert, es sollte untersucht werden ob sich toxische Wirkungen in Kombination verstärken oder abschwächen. Die Versuche zur Kombinationstoxikologie wurden mit verschiedenen Antibiotika-Kombinationen durchgeführt. Alle drei getesteten Antibiotika Sulfadiazin, Enrofloxacin und Tetracyclin zeigten in ihren Kombinationen synergistische toxische Effekte (Abbildung 12, Kapitel 3.3.1). Eine synergistische toxische Wirkung kann auftreten, wenn eine Substanz die Aufnahme einer anderen Substanz begünstigt (Anonymous, 2012b). Veränderungen der Wurzelmorphologie durch das Antibiotikum Sulfadiazin, welche von Micheli et al. (2012) beschrieben wurden, könnten möglicherweise diesen Effekt hervorrufen.

Während in den meisten Studien die direkten toxischen Effekte von Antibiotika und Schwermetallen einzeln untersucht werden, sind nur wenige Daten über die kombinatorischen Wirkungen auf Pflanzen bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass kleine Mengen Tetracyclin im Boden die Kupferaufnahme von Pflanzen steigern, ein Effekt auf das Wachstum wurde jedoch nicht beobachtet (Badea et al., 2013). Generell ist es möglich, dass die Kombination verschiedener toxischer Stoffe ihre Wirkung auf einen bestimmten Organismus abschwächt oder verstärkt. Verschiedene Antibiotika in Kombination zeigten synergistische toxische Effekte auf Cyanobakterien und Grünalgen (González-Pleiter et al., 2013). Bei Zugabe des Antibiotikums Trimethoprim wurde die Wachstumsinhibition von Mikroalgen, welche für Sulfadiazin und Sulfamethoxazol einzeln beobachtet wurde, in Kombination verstärkt (Eguchi et al., 2004).

Neben synergistischen Effekten können auch antagonistische Effekte auftreten, bei denen die Toxizität verschiedener Antibiotika in Kombination schwächer ist, als die der Einzelsubstanzen. So wirkte die Kombination von Fluorchinolonen und Tetracyclinen auf Zebrafische antagonistisch (Zhang et al., 2014). Die Wirkung von 10 verschiedenen Antibiotika auf *Daphnia magna* in binären Kombinationen waren entweder additiv oder antagonistisch (Dalla Bona et al., 2014). Während bei Schlammbakterien synergistische Effekte beobachtet wurden, wurden bei Mikroalgen sowohl additive, antagonistische und synergistische Effekte beobachtet (Christensen et al., 2006). Die Kombination von verschiedenen Pestiziden und Kupfer wirkte auf

Regenwürmer in den meisten Fällen additiv und in Einzelfällen synergistisch (Liang et al., 2003), wurden jedoch nur Schwermetalle miteinander kombiniert war die Wirkung eher additiv bis antagonistisch (Khalil et al., 1996; Weltje, 1998).

Es lässt sich nicht pauschalisieren, ob die toxischen Effekte von Antibiotika und Schwermetallen in verschiedenen Kombinationen additiv, synergistisch oder antagonistisch wirken. Die kombinatorischen toxischen Effekte von verschiedenen Stoffgemischen hängen von dem Testorganismus und von den getesteten Chemikalien ab. Es ist nicht auszuschließen, dass sich toxische Effekte verstärken, zumal die meisten Studien nur binäre Stoffgemische für die Beurteilung einsetzen, in vielen Wirtschaftsdüngern und Klärschlämmen jedoch wesentlich mehr Antibiotika und zudem in Kombination mit anderen organischen Schadstoffen und Schwermetallen gleichzeitig gefunden werden können.

Toxkits sind eine schnelle und kostengünstige Methode um festzustellen, ob chemische Substanzen potentiell toxisch sind. Wird eine toxische Wirkung ermittelt, lohnen weitere Untersuchungen mit anderen Methoden, beispielsweise Hydrokulturen oder Gefäßversuchen. Ein weiterer Vorteil von Toxkits ist, dass sie durch ihren einfachen Aufbau viele Interaktionen, wie verringerte Toxizität durch Adsorption an Boden oder Reaktionen der Substanzen mit Stoffen aus dem Boden ausschließen und somit ausschließlich den toxischen Effekt aufzeigen. Aus diesem Grund sind Toxkits geeignet, um kombinationstoxikologische Effekte zu untersuchen, da weitere Interaktionen als die der zu untersuchenden Substanzen weitgehend ausgeschlossen werden können. Toxische Effekte können unter Realbedingungen, wo weitere Faktoren relevant sind, geringer oder stärker ausfallen als in den Toxkits. Aus diesem Grund ist die Vergleichbarkeit mit Realbedingungen nur teilweise gegeben. Ein weiterer Nachteil besteht in der kurzen Versuchsdauer, welche es nicht ermöglicht langfristige Effekte aufzuzeigen. Daher ist das Ausbleiben eines toxischen Effekts im Toxkit keine Garantie, dass unter Realbedingungen kein Effekt auftritt. In Hydrokulturversuchen treten wie in Toxkits ebenfalls keine adsorptiven Effekte auf. Da in Hydrokultur eine Nährstofflösung statt destilliertem Wasser eingesetzt wird und ein Tag-Nacht Zyklus simuliert wird, kann ein solcher Versuch länger laufen als ein Toxkit. Durch den komplizierteren Versuchsaufbau können jedoch Interaktionen auftreten, welche das Testergebnis verfälschen können. Es ist beispielsweise

sicherzustellen, dass der zu testende Stoff nicht mit Bestandteilen der Nährlösung präzipitiert oder durch Lichteinfluss abgebaut wird.

4.3.2 Beurteilung des toxikologischen Potentials von Antibiotikawirkstoffen und Schwermetallen auf das Wachstum von *Sinapis alba* im Gefäßversuch am Beispiel der Enrofloxacin-Kupfer-Interaktion

Die Pflanzenverfügbarkeit von Kationen und Anionen ist wie ihre toxische Wirkung auf Pflanzen und Mikroorganismen am größten, wenn sie frei in Bodenlösung vorliegen (Scheffer, 1998a). Aus diesem Grund ist in den Toxkits sowie in Hydrokulturversuchen eine stärkere Toxizität der untersuchten Substanzen zu erwarten als in Gefäßversuchen mit Substrat, da hier Wechselwirkungen wahrscheinlich sind. Im Sandkulturversuch können toxische Stoffe gebunden werden, welche somit nicht mehr pflanzenverfügbar sind, wodurch realistischere Bedingungen abgebildet werden. Um eine Aussage hinsichtlich der Toxizität von Wirkstoffen auf das Pflanzenwachstum zu ermöglichen, reichen aus den genannten Gründen Versuche im wässrigen Medium nicht aus, die vorrangig die potentielle Toxizität abbilden.

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Gefäßversuch mit Sand als Substrat durchgeführt, in dem beispielhaft die Toxizität von Enrofloxacin und Kupfer auf das Pflanzenwachstum von *Sinapis alba* analysiert wurde (Kapitel 3.3.3). Auch ein Sandkulturversuch ist nicht direkt vergleichbar mit natürlich gelagertem Boden, hat aber den Vorteil, dass sich Faktoren wie die Nährstoffversorgung exakt einstellen lassen und dass sich zu Versuchsende die Wurzeln relativ gut beproben lassen. Parallel zum Gefäßversuch wurden Saugkerzen in pflanzenfreie Töpfe des Gefäßversuchs eingesetzt, um zu überprüfen wie viel Kupfer und Enrofloxacin in der Bodenlösung vorliegen, da insbesondere Antibiotika stark an Böden binden können (Hamscher et al., 2005; Thiele-Bruhn, 2003). Im Vorfeld wurde sichergestellt, dass die verwendeten Saugkerzen durchlässig für Enrofloxacin sind und die Konzentration der beprobten Lösungen mit denen aus der Saugkerze übereinstimmen. Die Ergebnisse der Toxkits, der Saugkerzenversuche und des Gefäßversuchs sollten

miteinander verglichen werden, um eine Aussage darüber zu treffen, welche Tests am besten geeignet sind die Toxizität von Kupfer und Enrofloxacin abzubilden.

Für die Kupferkonzentrationen des Gefäßversuchs wurden, in Anlehnung an einen Vorversuch, die Konzentrationen 1 – 6 mg/Gefäß gewählt. Da die 7 kg Sandboden im Gefäß bis zu 1 L Wasser aufnehmen konnten und zunächst davon ausgegangen wurde, dass die gesamte Kupfermenge in Lösung verbleibt, sollte die höchste Kupferkonzentration ausreichen um eine signifikante Wachstumshemmung hervorzurufen, da im Hydrokulturversuch bereits eine Konzentration von 3 mg/L eine Reduktion der Frischmasse um 36 % nach 24 Tagen hervorrief (Abbildung 17, Kapitel 3.3.2). Laut Literatur liegt eine übliche Kupferkonzentration in einer Acker-Bodenlösung zwischen 30 – 300 µg/L (Scheffer, 1998a), was deutlich über dem erwarteten Wert der Kupferkonzentration unter natürlichen Bedingungen in der Bodenlösung liegt.

Nach einer Versuchsdauer von 28 Tagen konnten im Gefäßversuch jedoch nur geringfügige Auswirkungen der Kupferkonzentration auf das Wachstum festgestellt werden (Kaptel 3.3.3). Durch die Saugkerzenversuche konnte ermittelt werden, dass je nach Konzentration nur 12 – 81 % des Kupfers in der Bodenlösung gelöst vorlag, wobei der Anteil des gelösten Kupfers in den höchsten Konzentrationen am niedrigsten war. Von den 6 mg Kupfer/Gefäß lagen nur 12 – 27 % in Lösung vor, was einer Konzentration von 1 – 2 mg/L im Bodenwasser entspricht (Abbildung 19, Kapitel 3.3.3). Bei einer Konzentration von 1 mg/L zeigte sich in der Hydrokultur nur eine geringe Verringerung der Gesamtfrischmasse von 2 % (Abbildung 17, Kapitel 3.3.2). Der nicht gelöste Teil des Kupfers im Sandkulturversuch lag vermutlich an Mineralien adsorbiert vor (McLaren et al., 1981; Scheffer, 1998a). Da ein großer Anteil des Kupfers nicht in Lösung vorlag und somit nicht pflanzenverfügbar und die Kupferkonzentration des Bodenwassers in der gleichen Größenordnung wie die in der Hydrokultur war, ist die Toxizität des Kupfers mit der des Hydrokulturversuchs vergleichbar. Das Phytotoxkit lieferte hingegen selbst bei weit höheren Konzentrationen von bis zu 24 mg/L keinen Hinweis auf eine Toxizität, was vermutlich der kurzen Laufzeit von 5 Tagen geschuldet ist (Tabelle 29, Kapitel 3.3.1).

Die Toxizität von Kupfer hängt maßgeblich mit der Löslichkeit zusammen, welche durch Komplexbildung, Präzipitation und Adsorption verringert werden kann (Erickson et al., 1996; Flemming et al., 1989). Aus diesem Grund sollte bei Toxizitätsversuchen

überprüft werden, wie viel des zu testenden Stoffes in Lösung bzw. gebunden vorliegt, um die Toxizität richtig einzuschätzen.

Die höchste Enrofloxacin-Konzentration im Gefäßversuch betrug 50 mg/ 7 kg Sand, was in etwa dem Maximalwert von 6,2 – 9,8 mg/kg Norfloxacin oder 3 – 5,8 mg/kg Ciprofloxacin, welcher in realen Böden gefunden wurde, entspricht (Morales-Muñoz et al., 2004). Im Gefäßversuch war die Gesamtfrischmasse nach 28 Tagen Kultivierung bei 50 mg/Gefäß Enrofloxacin um 47 % reduziert (Tabelle A 8, Anhang). Bodenwasseruntersuchungen zeigten, dass das Enrofloxacin nicht in Bodenlösung vorlag und somit vermutlich an den Sand adsorbiert wurde (Kapitel 3.3.3), was auch durch Literaturquellen bestätigt werden kann (Kumar et al., 2005; Thiele-Bruhn, 2003). Im Gegensatz zu Kupfer zeigte sich jedoch trotz der Adsorption ein starker toxischer Effekt. Da sowohl in dieser Arbeit, als auch in anderen Studien nachgewiesen wurde, dass Antibiotika in Pflanzen aufgenommen werden können (Boxall et al., 2006; Dolliver et al., 2007), müssen Pflanzen in der Lage sein, auch adsorbierte Antibiotika mobil zu machen und aufzunehmen. Möglicherweise wurde Enrofloxacin durch von Wurzeln ausgeschiedene Wurzelexsudate, welche unter anderem organische Säuren enthalten (Bais et al., 2006), wieder gelöst und die Aufnahme in die Pflanze ermöglicht.

Die toxische Wirkung des Enrofloxacins im Gefäßversuch lässt sich nur schwer mit der im Phytotoxkit vergleichen, da im Gefäßversuch nur die Wurzelmasse und im Phytotestkit die Wurzellänge ermittelt wurde. Im Phytotestkit war jedoch schon deutlich erkennbar, dass Enrofloxacin eine toxische Wirkung auf das Wurzelwachstum aufweist (Tabelle 29, Kapitel 3.3.1), wie sie auch von Migliore et al. (2003) gezeigt wurde. Es lässt sich nicht sagen welcher der Tests zur Toxizität am besten geeignet ist, jeder der Tests hat seine Vor- und Nachteile. Somit kommt es eher darauf an, welcher Aspekt untersucht werden soll. Für schnelle, kostengünstige Untersuchungen auf direkte toxische Effekte sind Toxkits geeignet. Soll eine Aussage über die mittelfristige akute Toxizität getroffen werden eignet sich ein Hydrokulturversuch. Langfristige Toxizität lässt sich am ehesten mit einem Gefäßversuch untersuchen, welcher im Vergleich zu Toxtests und Hydrokulturversuchen realistischere Versuchsbedingungen ermöglicht und wichtige Aspekte wie die Adsorption an den Boden nicht vernachlässigt.

4.3.3 Einschätzung des toxikologischen Potentials von Wirtschaftsdüngern, Klärschlämmen und Gärresten

Durch die Ausbringung von kontaminierten Wirtschaftsdüngern und Klärschlämmen gelangen viele verschiedene Antibiotika, häufig auch in Kombination, in die Umwelt. Es stellte sich daher die Frage, ob von der Düngung ein Risiko für Mensch und Umwelt ausgeht. Werden die berechneten Frachten aus Kapitel 4.2.2 oder die von Ratsak et al. (2013) zugrunde gelegt, so werden durch die Düngung mit Wirtschaftsdüngern, Klärschlämmen und Gärresten nur geringe Mengen Antibiotika auf Agrarflächen ausgebracht. In Bodenuntersuchungen realer Feldböden wurden jedoch wesentlich höhere Antibiotikakonzentrationen nachgewiesen (Hamscher et al., 2005; Kemper et al., 2008; Morales-Muñoz et al., 2004), als die als Worst-Case-Szenario berechneten Frachten. Gründe hierfür könnten sein, dass zumindest in Einzelfällen höher belastete Proben auftreten als die in dieser Arbeit analysierten, oder eine Akkumulation im Boden stattfindet. Die von Morales-Muñoz et al. (2004) gefundenen Bodenkonzentrationen liegen in dem Konzentrationsbereich, in dem direkte toxische Effekte auf das Pflanzenwachstum zu erwarten sind. Derart hohe Bodenkonzentrationen sind vermutlich eher ein Einzelfall.

Legt man den am höchsten mit Enrofloxacin belasteten Wirtschaftsdünger, welcher in dieser Arbeit analysiert wurde, zugrunde (Tabelle 34, Kapitel 4.2.2), müsste die 400-fache Jahresmenge ausgebracht werden um die von Morales-Muñoz et al. (2004) beschriebene Konzentration zu erreichen. Eine direkte Schädigung der Pflanzen ist dennoch nicht völlig auszuschließen, da in dieser Arbeit synergistische toxische Effekte auf *Sinapis alba* bei der Kombination verschiedener Antibiotika festgestellt wurden (Abbildung 14, Kapitel 3.3.1). Zusammen mit der Tatsache, dass viele der analysierten Proben eine Mehrfachkontaminierung mit Antibiotika aufwiesen, könnte möglicherweise eine Mischung aus vielen verschiedenen Antibiotika in geringer Konzentration die Toxizität so verstärken, dass ein Effekt auftreten könnte.

Während direkte Effekte auf das Pflanzenwachstum eher unwahrscheinlich sind, könnten Mikroorganismen im Boden oder andere Bodenorganismen geschädigt werden. Bodenmikroorganismen übernehmen wichtige Funktionen im Boden, wie den Abbau von organischer Substanz und Mineralisierung von Nährstoffen (Kumar et

al., 2005). Eine Veränderung der Zusammensetzung oder Verringerung der Anzahl der Bodenorganismen könnte somit negative Auswirkungen auf die Nährstoffverfügbarkeit im Boden haben. Antibiotika sind darauf ausgelegt Bakterien zu schädigen und können schon in sehr geringen Konzentrationen von wenigen µg/L auf Bodenorganismen wirken (Anonymous, 2016b; Halling-Sørensen et al., 2003). Regenwürmer sind wichtige Bewohner des Bodens, welche unter anderem für eine Belüftung des Bodens sorgen, Nährstoffe aufschließen und das Mikrogenleben fördern (Finck, 1952). Toxische Wirkungen von Antibiotika im Boden auf Regenwürmer sind jedoch unwahrscheinlich, da die Effektkonzentrationen für verschiedene Antibiotika bei 3 – 5 g/kg Boden liegen (Bague et al., 2000; Gao et al., 2014).

Antibiotika können durch Ausschwemmung aus Böden in Oberflächengewässer und Grundwasser gelangen (Hamscher et al., 2003; Thiele-Bruhn, 2003). In Gewässern können Wasserorganismen wie Cyanobakterien, Wasserflöhe oder Grünalgen geschädigt werden, letztere weisen sehr niedrige EC₅₀-Werte von 5 – 100 µg/L auf (Halling Sørensen, 2000). In einer Studie zum Eintrag von Antibiotika in Gewässer in Nordrhein-Westfalen wurden hauptsächlich Humanantibiotika in Konzentrationen bis zu 300 ng/L gefunden (Christian et al., 2005). Die Antibiotikakonzentration kann im Ablaufwasser von kontaminierten Ackerflächen weit höher sein, es wurden bis zu 700 µg/L detektiert, was die Effektkonzentrationen von Grünalgen um ein vielfaches übersteigt (Kay et al., 2005). Eine Schädigung von Wasserorganismen ist demnach nicht auszuschließen.

Vor dem Hintergrund, dass die untersuchten Wirtschaftsdünger und Klärschlämme häufig mehrere Antibiotika enthalten (Tabelle A 6, Tabelle A 7), muss beachtet werden, dass sich toxische Wirkungen in Stoffkombinationen verstärken können (Christensen et al., 2006; González-Pleiter et al., 2013). In der Regel werden kombinationstoxikologische Versuche in binären Systemen durchgeführt, es gibt nur wenig Daten zur Kombinationstoxikologie von Antibiotika in Multi-Komponenten Systemen, da diese wesentlich aufwändiger sind. In einer Studie mit *Pseudokirchneriella subcapitata* und *Anabaena CPB4337* zeigten sich synergistische toxische Effekte durch Mischungen aus vier bzw. fünf verschiedenen Antibiotika (González-Pleiter et al., 2013), was es möglich erscheinen lässt, dass synergistische toxische Effekte auch bei anderen Organismen auftreten können.

Pflanzen können Antibiotika aus der Düngung mit kontaminierten Wirtschaftsdüngern aufnehmen, die Aufnahmeraten sind jedoch sehr gering und betragen für Sulfadiazin 0,1 % (Dolliver et al., 2007). Die gesetzlichen Grenzwerte von Antibiotika in Fleisch für die untersuchten Tetracycline liegen bei jeweils 100 µg/kg, die Summe von Ciprofloxacin und Enrofloxacin sowie die Summe aller Sulfonamide darf 100 µg/kg nicht übersteigen (Anonymous, 2009b). Werden die berechneten Antibiotikafrachten durch Düngung betrachtet und der Grenzwert für Fleisch auf Pflanzen bezogen, ist es unwahrscheinlich, dass diese Grenzwerte auch nur ansatzweise erreicht werden. Abgesehen davon ist in diesen Konzentrationen nicht von einer akuten Toxizität beim Menschen auszugehen, da Antibiotika Dosierungen in der Humantherapie mit 500 – 5000 mg/Tag weit über den Mengen liegen die über die Nahrung aufgenommen werden könnten (Wacha et al., 2010).

Ein Risiko für den Menschen könnte aus der Verbreitung von resistenten Mikroorganismen in der Umwelt bestehen, da Antibiotika gegen eine Infektion mit resistenten Bakterien nicht mehr wirken (Martinez, 2009). Resistente Bakterien wurden in Abläufen von Klärwerken gefunden und können auf diesem Weg in Gewässer und somit in die Umwelt gelangen (Costanzo et al., 2005). Resistenzen entstehen häufig durch Spontanmutationen einzelner Bakterien, welche sie widerstandsfähiger gegen bestimmte Antibiotika machen. Bei Kontakt mit Antibiotika vermehren sich die resistenten Bakterien durch selektiven Druck, um dem vorzubeugen müssen Antibiotika genügend lang und in ausreichender Konzentration angewendet werden (Cottier, 2013). Wirtschaftsdünger enthalten häufig niedrige Konzentrationen von Antibiotika und bieten somit ein günstiges Milieu für die Bildung von Resistenzen. Eine Resistenzbildung von Mikroorganismen wurde bei niedrigen Konzentrationen von <100 µg/kg in Gülle beobachtet (Hölzel et al., 2010; Knapp et al., 2008). Resistenzgene werden in der Gülle während der Lagerung gebildet und können mit der Düngung in den Boden gelangen, wo sie jedoch auch abgebaut werden können (Heuer et al., 2008). Bei Antibiotika-Konzentrationen von 10 mg/kg wurde sogar eine Akkumulation von Resistenzgenen festgestellt (Heuer et al., 2011). Resistente Mikroorganismen können durch die Düngung in den Boden gelangen, es ist jedoch auch möglich, dass die Resistenzen von Bodenmikroorganismen durch selektiven Druck ausgebildet werden (Chessa et al., 2016; Heuer et al., 2008; Heuer et al., 2007). Resistenzen werden nicht nur durch Selektion verbreitet,

Mikroorganismen können Resistenzgene untereinander transferieren und somit erwerben oder austauschen (Levy & Marshall, 2004).

Bei den gegebenen Antibiotikagehalten in Wirtschaftsdüngern und Klärschlämmen und den resultierenden Frachten sind keine direkten toxischen Effekte auf Pflanzen oder den Menschen durch mit Antibiotika kontaminierte Lebensmittel zu erwarten. Die Tatsache, dass ein großer Teil der Wirtschaftsdünger und Klärschlämme mit Antibiotika belastet war, unterstreicht, dass eine indirekte Gefahr durch die Bildung von Resistenzen besteht. Es ist nicht auszuschließen, dass pflanzliche Erzeugnisse, welche auf kontaminierten Ackerflächen angebaut werden, mit resistenten Mikroorganismen kontaminiert sind. Handelt es sich dabei um ein Erzeugnis wie Salat, welches vor Verzehr nicht erhitzt wird und unter Umständen nicht gründlich gereinigt wird, könnte es im schlimmsten Fall zu einer Aufnahme von resistenten Mikroorganismen durch den Menschen kommen.

5 Zusammenfassung

Wirtschaftsdünger, Gärreste und Klärschlämme fallen in großen Mengen an und werden wegen ihres Nährstoffgehaltes für die Düngung in der Landwirtschaft genutzt, wodurch sie Schadstoffe wie Schwermetalle und Antibiotika in landwirtschaftliche Böden transportieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die methodischen Grundlagen der chemischen Analyse dieser Stoffe in Wirtschaftsdüngern, Gärresten und Klärschlämmen zu evaluieren und insbesondere für Antibiotika ein geeignetes Analyseverfahren zu entwickeln. In Gefäß- und Modellversuchen wurden zudem direkte toxische und kombinatorische Effekte von Antibiotika und Schwermetallen auf Modellorganismen geprüft und deren ökologische Relevanz abgeschätzt.

Die Arbeit erbrachte folgende Ergebnisse:

Die CAL-Extraktion von P erwies sich im Vergleich zur Wasser-Extraktion als weniger matrixabhängig und genauer bei der Konzentrationsbestimmung. Die Ergebnisse der CAL-Extraktion entsprachen denen der NAC-Extraktion. Für die eigentliche P-Bestimmung erwies sich die ICP-OES-Messung als genauer im Vergleich zur Kolorimetrie.

Tendenziell fanden sich in den Endprodukten der anaeroben Fermentation niedrigere Median- und Maximalkonzentrationen von Antibiotika als in den Eingangssubstraten, die Größenordnung war jedoch vergleichbar. Die Mediankonzentrationen von Wirtschaftsdüngern und Klärschlämmen lagen häufig im Bereich von 100 µg bis wenige mg kg⁻¹ Trockenmasse, der Maximalwert eines Gärrests bei 29,8 mg kg⁻¹ Tetracyclin. Bei vielen Proben wurde eine Kontamination mit mehreren Antibiotika beobachtet.

In Modellversuchen (Toxkits) wurde festgestellt, dass Antibiotika in hohen Konzentrationen toxisch auf *Daphnia magna* und *Sinapis alba* wirken, und zwar in Form einer Immobilisierung von *Daphnia magna* und einer Reduzierung der Wurzellänge von *Sinapis alba*. Die Antibiotika Enrofloxacin, Sulfadiazin und Tetracyclin wiesen in ihrer binären Kombination in Toxkits synergistische toxische Effekte auf. Enrofloxacin konnte im Gefäßversuch nicht in der Bodenlösung detektiert werden, was als Hinweis auf eine Adsorption an die Bodenmatrix gewertet werden

kann. Ab einer Enrofloxacin-Konzentration von $3,6 \text{ mg kg}^{-1}$ Sandboden trat eine Reduktion der Biomasseentwicklung von *Sinapis alba* auf und Enrofloxacin konnte in geringen Konzentrationen im Pflanzenmaterial nachgewiesen werden.

Die berechnete Antibiotika-Fracht durch Düngung mit der am stärksten kontaminierten Gärrestprobe betrug $22 \text{ } \mu\text{g Tetracyclin kg}^{-1}$ Boden, was deutlich unter den schädlichen Effektkonzentrationen für *Sinapis alba* liegt. Auf Grundlage dieser Daten ist derzeit nicht mit einer direkten toxischen Wirkung auf Pflanzen zu rechnen, wenn Wirtschaftsdünger oder Klärschlämme zur Düngung eingesetzt werden. Andere schädliche Effekte in der Umwelt, welche in dieser Studie nicht betrachtet wurden, können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Summary

Manure, digestates and sewage sludge are produced in large amounts and are used in agriculture because of their nutrient concentration. Through application they can carry pollutants like heavy metals and antibiotics into agricultural soils.

The aim of this work was to evaluate the methodological basics of analysis for the phosphorus (P) content in manure, digestates and sewage sludge and the development of a suitable analytical method especially for antibiotics in these complex matrices. Acute and combinatory toxic effects of heavy metals and antibiotics were investigated in a pot trial and in model experiments to estimate their ecological relevance.

This work provided the following results:

The extraction of P by CAL delivered more reasonable results than a water extraction because CAL extraction was less affected by the matrix. CAL and NAC extraction delivered comparable results so both can be used to determine the P content in digestates. It was shown that the P determination by ICP-OES was more suitable to determine the P content in comparison to the colorimetric measurement by a spectral photometer as P contents were partly overestimated.

The median and maximum concentrations of antibiotics tend to be lower in digestates than in the substrates of the anaerobic fermentation. However, the contaminations were in the same order of magnitude. Median antibiotic concentrations in manure, digestate and sewage sludge samples were in the range of 100 μg to a few mg kg^{-1} on a dry matter basis. The maximum concentration determined in a digestate was 29.8 $\text{mg tetracycline kg}^{-1}$ DW.

In small-scale tests (toxkits) it was proven that antibiotics in high concentrations are toxic to *Daphnia magna* and *Sinapis alba*. *Daphnia magna* was immobilised by high antibiotic concentrations and in case of *Sinapis alba* the root length was reduced by high concentrations of antibiotics. In the toxkits experiments the antibiotics enrofloxacin, sulfadiazine and tetracycline revealed synergistic toxic effects in combination. In a pot experiment, where the combinatory effect of enrofloxacin and copper on growth of *Sinapis alba* was investigated, it was shown that no enrofloxacin could be detected in the soil solution. This indicates a high adsorption of enrofloxacin

to the soil-matrix. In concentrations of 3.6 mg kg^{-1} soil enrofloxacin caused a reduction in biomass development of *Sinapis alba* and could be detected in the plant material.

In a worst-case scenario it was calculated that up to $22 \text{ } \mu\text{g tetracycline kg}^{-1}$ soil could be transferred to the field as a result of fertilization. This concentration is significantly lower than the toxic effect concentration which was determined for *Sinapis alba*. Based on the data obtained in the present work, it can be concluded, that currently no acute toxic effects on plant growth should be expected due to fertilization with manure, digestates and sewage sludge. Nevertheless, other toxic effects which were not evaluated in this work, could pose a risk for the environment.

Anhang

Tabelle A 1: Phosphorgehalte verschiedener P-Extraktionsverfahren von Proben einer Biogasanlage (bei 40 °C getrocknete und gemahlene Proben, Messung per ICP-OES)

Probe	TM [%]	P _{ges} [mg/kg TM]	P _{ges} [mg/kg FM]	P _{Wasser} [% von P _{ges}]	P _{CAL} [% von P _{ges}]	P _{NAC} [% von P _{ges}]	P ₂ O ₅ _{ges} [mg/kg FM]	P ₂ O ₅ _{ges} [kg/t FM]	P ₂ O ₅ _{CAL} [kg/t FM]
Mais	30,4	2004	609	86	85	78	1396	1,4	1,2
Zuckerrübe	25,0	1302	326	70	63	49	746	0,7	0,5
Hähnchenkot	65,9	9380	6182	59	74	49	14165	14,2	10,5
Fermenter	12,5	13800	1725	63	93	96	3953	4,0	3,7
Nachgärer	12,0	17880	2146	49	79	86	4917	4,9	3,9
Vollgärrest	12,0	22186	2662	43	87	94	6101	6,1	5,3
Gärrest (fest)	32,3	9000	2907	76	88	71	6661	6,7	5,9
Gärrest (flüssig)	7,6	18488	1405	52	80	89	3220	3,2	2,6

ges: Gesamtmenge, TM: Trockenmasse, FM: Frischmasse

Tabelle A 2: Ionisierungsparameter der untersuchten Antibiotika und internen Standards

Analyt	Q1 Masse [amu]	Q3 Masse [amu]	DP [Volt]	EP [Volt]	CE [Volt]	CXP [Volt]
Sulfadiazin	251,0	156,0	26	10	21	12
	251,0	92,1	26	10	37	6
	251,0	108,0	26	10	33	6
Sulfamethazin	279,0	186,1	36	10	25	12
	279,0	92,0	36	10	25	14
	279,0	124,1	36	10	37	8
Ciprofloxacin	332,1	288,1	41	10	25	16
	332,1	245,0	41	10	35	18
	332,1	314,1	41	10	29	8
Enrofloxacin	360,1	316,2	51	10	27	8
	360,1	245,1	51	10	37	16
	360,1	342,2	51	10	31	8
Difloxacin	400,1	356,2	51	10	27	8
	400,1	299,0	51	10	39	16
	400,1	382,1	51	10	31	10
Tetracyclin	445,0	410,0	36	10	27	10
	445,0	427,1	36	10	19	8
	445,0	154,0	36	10	39	10
Oxytetracilin	461,0	426,1	41	10	27	10
	461,0	443,0	41	10	17	4
	461,0	444,1	41	10	21	12
Chlortetracyclin	479,0	461,9	41	10	25	12
	479,0	444,0	41	10	29	12
	479,0	154,0	41	10	43	12
Sulfamethoxazol	254,1	156,0	51	10	23	12
	254,1	188,1	51	10	19	14
	254,1	160,1	51	10	27	10
Norfloxacin	320,1	276,1	1	10	25	16
	320,1	233,1	1	10	35	18
	320,1	302,1	1	10	29	16
Methacyclin	443,2	426,0	26	10	23	12
	443,2	201,1	26	10	47	14
	443,2	381,0	26	10	33	10
Ofloxacin	362,0	318,2	1	10	27	8

Analyt	Q1 Masse [amu]	Q3 Masse [amu]	DP [Volt]	EP [Volt]	CE [Volt]	CXP [Volt]
	362,0	261,1	1	10	39	14
	362,0	221,1	1	10	51	16
Demeclocyclin	465,1	448,0	51	10	23	12
	465,1	430,0	51	10	31	12
	465,1	154,1	51	10	41	10

Tabelle A 3: Einfluss von Zerkleinerung und Trocknung auf die P-Extraktion (Wasser-Extraktion, ICP-Messung, Tukey-Kramer LSD _{5%})

		[mg P/kg TM]		
		Hähnchenkot	Vollgärrest	Mais
Unzerkleinert	Frisch	6295	4400	1535
	Gefroren	5589	4653	1671
	40 °C	4108	5331	1567
	Getrocknet+eingeweicht	6040	6780	1539
Zerkleinert	Frisch	6248	3639	1627
	Gefroren	6012	4723	1733
	40 °C	5362	4555	1558
Vermahlen	Getrocknet	5558	9599	1725
LSD _{5%}		545	441	191
		Zuckerrübe	Fermenter	Nachgärer
Unzerkleinert	Frisch	400	4064	3308
	Gefroren	744	4117	4469
	40 °C	839	5042	4625
	Getrocknet+eingeweicht	952	6269	6776
Zerkleinert	Frisch	456	3980	4090
	Gefroren	832	4100	4418
	40 °C	577	3168	3387
Vermahlen	Getrocknet	907	8669	8773
LSD _{5%}		96	484	468
		Gärrest (fest)	Gärrest (flüssig)	
Unzerkleinert	Frisch	3728	6144	
	Gefroren	4321	4298	
	40 °C	3493	7378	
	Getrocknet+eingeweicht	3808	8971	
Zerkleinert	Frisch	2129	6144	
	Gefroren	3547	4598	
	40 °C	4098	4942	
Vermahlen	Getrocknet	6799	9615	
LSD _{5%}		417	552	

Tabelle A 4: Einfluss von Zerkleinerung und Trocknung auf die P-Extraktion (CAL-Extraktion, ICP-Messung, Tukey-Kramer LSD 5%)

		[mg P/kg TM]		
		Hähnchenkot	Vollgärrest	Mais
Unzerkleinert	Frisch	6776	19375	1641
	Gefroren	6834	19590	1547
	40 °C	5647	12232	1617
	Getrocknet+eingeweicht	6695	15264	1351
Zerkleinert	Frisch	6632	19700	1414
	Gefroren	6209	18267	1616
	40 °C	6465	13177	1633
Vermahlen	Getrocknet+eingeweicht	6934	19198	1700
LSD 5%		901	991	221
		Zuckerrübe	Fermenter	Nachgärer
Unzerkleinert	Frisch	577	11889	14536
	Gefroren	658	11932	13911
	40 °C	771	10819	7511
	Getrocknet+eingeweicht	845	10660	13438
Zerkleinert	Frisch	594	12262	13967
	Gefroren	671	10778	12789
	40 °C	630	8959	10484
Vermahlen	Getrocknet	814	12834	14125
LSD 5%		100	617	784
		Gärrest (fest)	Gärrest (flüssig)	
Unzerkleinert	Frisch	8486	13586	
	Gefroren	8092	14694	
	40 °C	6853	8257	
	Getrocknet+eingeweicht	8051	13434	
Zerkleinert	Frisch	8827	13586	
	Gefroren	8219	12865	
	40 °C	7366	10444	
Vermahlen	Getrocknet	7933	14809	
LSD 5%		760	1338	

Tabelle A 5: Mittelwerte der Phosphorextraktion mit Wasser und CAL aus frischem, zerkleinertem Probenmaterial [mg/kg TM]

Material	Extraktion	Mittelwert P-kol	SD	Mittelwert P-ICP	SD	P-Total-ICP	SD
Mais	Wasser	2849	107	1628	25	2004	40
Zuckerrüben	Wasser	749	63	456	39	1302	107
Hähnchenkot	Wasser	8942	539	6249	339	9380	342
Fermenter	Wasser	6026	183	3980	52	13800	792
Nachgärer	Wasser	6935	241	4091	199	17880	625
Vollgärrest	Wasser	7580	301	3639	70	22186	736
Gärrest (fest)	Wasser	4954	585	2129	60	9000	481
Gärrest (flüssig)	Wasser	6888	581	6144	30	18488	312
Mais	CAL	1650	64	1414	76	2004	40
Zuckerrüben	CAL	648	84	595	93	1302	107
Hähnchenkot	CAL	6189	155	6632	233	9380	342
Fermenter	CAL	14311	375	12262	245	13800	792
Nachgärer	CAL	15641	310	13967	203	17880	625
Vollgärrest	CAL	23378	731	19700	447	22186	736
Gärrest (fest)	CAL	10501	2061	8827	495	9000	481
Gärrest (flüssig)	CAL	15079	1808	13586	160	18488	312

SD: Standardabweichung, P-kol: kolorimetrisch bestimmter P-Gehalt, P-ICP: per ICP bestimmter P-Gehalt, P-Total-ICP: Gesamt-P-Gehalt aus Königswasseraufschluss und ICP-Messung

Tabelle A 6: Mittelwerte der Antibiotikagehalte (Dreifachbestimmung) der Eingangssubstrate vor der anaeroben Vergärung nach Tierart der Gülle und Probenart [ug/g TM]

Probencode	Tierart/Probenart	SD	SM	CP	EN	TC	OTC	CTC
FI1A	Rind	<LOD	<LOD	<LOD	79,2	<LOD	<LOD	<LOD
FI1B	Geflügel	<LOD	<LOD	<LOD	81,6	<LOD	<LOD	<LOD
FI4	Rind	<LOD	<LOD	<LOD	88,6	<LOD	<LOD	<LOD
FI6	Rind	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
FI9	Rind	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
FI12A	Schwein	203	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1426	<LOD
FI12B	Rind	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
FI19	Schwein	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
FI21	Schwein	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	7781	<LOD
FI22	Schwein	<LOD	<LOD	<LOD	41,3	<LOD	411	<LOD
FI25	Schwein	66,4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
FI28	Schwein	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOQ	113	<LOD	<LOD
FI29	Klärschlamm	<LOD	<LOD	220	<LOQ	274	<LOD	<LOD
FI30	Klärschlamm	<LOQ	<LOD	951	39,2	2087	<LOD	<LOD
FI34	Klärschlamm	18,0	<LOD	547	<LOQ	1027	<LOD	<LOD
FI37	Klärschlamm	<LOD	<LOD	228	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
FI41	Klärschlamm	<LOQ	<LOD	1338	<LOQ	1534	<LOD	<LOD
FI45	Klärschlamm	<LOD	<LOD	1428	<LOD	1382	<LOD	<LOD
SW24	Rind/Schwein	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD
SW27	Geflügel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
SW28	Schwein	99,1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
SW29	Geflügel	24,4	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD
SW50	Klärschlamm	787	<LOD	243	<LOD	455	<LOD	<LOD
SW54	Klärschlamm	<LOD	<LOD	679	<LOD	906	<LOD	<LOD
SW57	Rind	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1102	<LOD
SW58	Rind	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
SW59	Schwein	231	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	216	<LOD
SW60	Geflügel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
SW61	Rind	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	660	<LOD
SW62	Rind	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
SW67	Klärschlamm	10,7	<LOD	872	<LOD	2440	<LOD	<LOD
GE02-04	Rind	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	132	186	<LOD
GE02-07	Geflügel	<LOD	<LOD	1308	8626	<LOD	<LOD	<LOD
GE03-02	Rind/Schwein	24,4	<LOD	<LOD	27,2	41,9	<LOQ	843

Probencode	Tierart/Probenart	SD	SM	CP	EN	TC	OTC	CTC
GE04-01	Geflügel	73,3	28,3	<LOQ	1738	8180	<LOD	<LOD
GE05-03	Geflügel	<LOD	<LOD	307	4798	<LOD	<LOD	<LOD
GE05-04	Geflügel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
GE06-03	Geflügel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD
GE07-01	Klärschlamm	<LOD	<LOD	1969	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD
GE07-02	Klärschlamm	<LOD	<LOD	1340	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD
GE09-04	Rind	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Out11	Schwein	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1846	<LOD
Out9	Rind	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	124	<LOQ	<LOD

SD: Sulfadiazin, SM: Sulfamethazin, CP: Ciprofloxacin, EN: Enrofloxacin, TC: Tetracyclin, OTC: Oxytetracyclin, CTC: Chlortetracyclin, LOD: Limit of Detection, LOQ: Limit of Quantification

Tabelle A 7: Mittelwerte der Antibiotikagehalte (Dreifachbestimmung) der Endprodukte nach der anaeroben Vergärung nach Tierart der Gülle und Probenart [ug/g TM]

Probencode	Tierart/ Probenart	SD	SM	CP	EN	TC	OTC	CTC
FI3	Rind/Geflügel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
FI5	Rind	<LOD	<LOD	<LOD	147	<LOD	<LOD	<LOD
FI8	Rind	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	196	<LOD
FI11	Rind	233	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
FI13	Rind/Schwein	37,6	<LOD	<LOD	82,1	<LOD	196	<LOD
FI14	Rind/Schwein	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
FI16	Schwein	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
FI17	Schwein	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
FI18	NP- Konzentrat	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
FI20	Schwein	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2381	<LOD
FI23	Schwein	142	<LOD	<LOD	44,2	<LOD	131	<LOD
FI26	Schwein/ Klärschlamm	21,5	<LOD	<LOD	52,9	513	<LOD	<LOD
FI27	Schwein/ Klärschlamm	31,0	<LOD	63,1	42,5	361	<LOD	<LOD
FI31	Klärschlamm	<LOD	<LOD	877	<LOD	1485	<LOD	<LOD
FI32	Klärschlamm	<LOD	<LOD	871	<LOD	1464	<LOD	<LOD
FI33	Klärschlamm	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
FI36	Klärschlamm	<LOD	<LOD	346	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
FI39	Klärschlamm	<LOD	<LOD	177	<LOD	428	<LOD	<LOD
FI42	Klärschlamm	12,4	<LOD	614	<LOD	461	<LOD	<LOD
FI43	Klärschlamm	<LOD	<LOD	508	<LOD	373	<LOD	<LOD
FI44	Klärschlamm	<LOD	<LOD	86,8	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
SW26	Rind/Schwein	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
SW30	Geflügel/ Schwein	231	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
SW53	Klärschlamm	<LOD	<LOD	1228	<LOD	1708	<LOD	<LOD
SW56	Klärschlamm	<LOD	<LOD	1668	<LOD	1565	<LOD	<LOD
SW65	Rind/Schwein/ Geflügel	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD
SW66	Rind	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD
SW69	Klärschlamm	<LOD	<LOD	396	<LOD	445	<LOD	<LOD

Probencode	Tierart/ Probenart	SD	SM	CP	EN	TC	OTC	CTC
GE02-08	Rind/Geflügel	77,1	<LOD	<LOD	<LOQ	193	<LOD	<LOD
GE03-05	Rind/Schwein	75,3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
GE04-06	Geflügel	363	59,0	121	2406	15148	285	<LOD
GE04-07	Geflügel	254	117	<LOD	1857	29758	815	<LOD
GE04-08	Geflügel	99,0	22,4	<LOQ	946	4290	97,4	<LOD
GE05-07	Geflügel	<LOD	<LOD	<LOD	409	<LOD	<LOD	<LOD
GE05-08	Geflügel	<LOD	<LOD	<LOD	342	<LOD	<LOD	<LOD
GE06-06	Geflügel	<LOD	<LOD	<LOD	124	<LOD	<LOD	<LOD
GE06-07	Geflügel	<LOD	<LOQ	<LOD	395	<LOD	<LOD	<LOD
GE06-08	Geflügel	<LOD	<LOD	<LOD	320	<LOD	<LOD	<LOD
GE07-05	Klärschlamm	<LOD	<LOD	1686	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD
GE09-06	Rind	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
GE10-01	Struvit	<LOD	<LOD	27,7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Klärschlamm	Klärschlamm							
24.7.		<LOD	<LOD	1801	22,9	<LOD	<LOD	<LOD
Out Gärrest	Geflügel							
Nov 2015		<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	187	<LOD
Out1	Klärschlamm	<LOD	<LOD	851	<LOD	36,2	<LOD	<LOD

SD: Sulfadiazin, SM: Sulfamethazin, CP: Ciprofloxacin, EN: Enrofloxacin, TC: Tetracyclin, OTC: Oxytetracyclin, CTC: Chlortetracyclin, LOD: Limit of Detection, LOQ: Limit of Quantification

Tabelle A 8: Statistische Auswertung der Frischmassen des Gefäßversuch mit Enrofloxacin und Kupfer [g Pflanzenmaterial/Gefäß], LSD_{5%} Test mit dem Programm Costat von Cohort

Variable	Kupferstufe		Enrofloxacin		Interaktion
	[mg/Gefäß]	FM [g/Gefäß]	[mg/Gefäß]	FM [g/Gefäß]	
Frischmasse					
Wurzel	0	39,9	0	46,1	**
	1	37,2	5	42,7	
	3	36,8	25	37,4	
	6	33,6	50	20,4	
Stiel	0	40,6	0	44,6	ns
	1	37,7	5	47,5	
	3	40,7	25	42,2	
	6	39,6	50	24,3	
Blatt	0	42,9	0	45,6	ns
	1	37,4	5	45,6	
	3	41,0	25	43,1	
	6	42,0	50	28,9	
Gesamt	0	123	0	137	ns
	1	112	5	136	
	3	118	25	123	
	6	115	50	73,6	

FM: Frischmasse

Tabelle A 9: Kupfergehalte in verschiedenen Pflanzenteilen aus dem Gefäßversuch, (n=4, W: Wurzel, S: Stiel, B: Blatt)

Pflanzenteil	Enrofloxacin [mg/Gefäß]	Kupfer [mg/Gefäß]	Mittelwert von Kupfer im Pflanzenteil [mg/kg TM]	SD
W	0	0	11,9	2,4
S	0	0	4,3	0,6
B	0	0	7,9	2,4
W	5	0	13,4	1,6
S	5	0	4,2	0,4
B	5	0	7,2	0,7
W	25	0	11,1	2,1
S	25	0	3,9	0,3
B	25	0	6,3	0,9
W	50	0	16,3	4,5
S	50	0	8,3	0,9
B	50	0	4,2	0,5
W	0	1	14,0	1,0
S	0	1	4,7	0,2
B	0	1	9,9	0,5
W	5	1	15,2	2,4
S	5	1	4,4	0,4
B	5	1	8,6	0,4
W	25	1	15,9	4,2
S	25	1	4,3	0,1
B	25	1	7,8	0,7
W	50	1	15,2	3,9
S	50	1	6,2	1,1
B	50	1	8,4	0,3
W	0	3	19,5	2,0
S	0	3	5,3	0,3
B	0	3	12,9	1,7
W	5	3	20,9	1,3
S	5	3	5,8	0,4
B	5	3	14,7	3,7
W	25	3	20,8	5,3
S	25	3	5,5	0,8
B	25	3	12,8	2,4
W	50	3	26,0	4,5
S	50	3	5,7	0,8
B	50	3	10,5	2,0
W	0	6	36,7	14,0
S	0	6	6,7	1,2

Pflanzenteil	Enrofloxacin [mg/Gefäß]	Kupfer [mg/Gefäß]	Mittelwert von Kupfer im Pflanzenteil [mg/kg TM]	SD
B	0	6	18,2	3,0
W	5	6	31,2	3,8
S	5	6	6,5	0,5
B	5	6	19,3	2,9
W	25	6	34,7	12,3
S	25	6	6,3	1,3
B	25	6	16,7	6,2
W	50	6	32,3	7,2
S	50	6	7,2	1,1
B	50	6	16,6	2,0

Tabelle A 10: Enrofloxacingehalt der Pflanzenteile (W: Wurzel, S: Stiel, B: Blatt)

Gefäßnummer und Pflanzenteil	Enrofloxacin [mg/Gefäß]	Kupfer [mg/Gefäß]	Enrofloxacin [µg/kg TM]
7w	5	0	32,1
7s	5	0	17,1
7b	5	0	23,2
12w	25	0	94,1
12s	25	0	42,5
12b	25	0	80,4
13w	50	0	974
13s	50	0	359
13b	50	0	298
21w	5	1	77,4
21s	5	1	20,4
21b	5	1	17,2
27w	25	1	138
27s	25	1	46,4
27b	25	1	51,8
31w	50	1	336
31s	50	1	38,2
31b	50	1	16,4
38w	5	3	34,1
38s	5	3	25,8
38b	5	3	<LOQ
44w	25	3	25,7
44s	25	3	16,9
44b	25	3	13,3
45w	50	3	55,2
45s	50	3	14,7
45b	50	3	174
56w	5	6	41,4
56s	5	6	15,4
56b	5	6	11,7
58w	25	6	433
58s	25	6	11,9
58b	25	6	39,4
64w	50	6	439

Gefäßnummer und Pflanzenteil	Enrofloxacin [mg/Gefäß]	Kupfer [mg/Gefäß]	Enrofloxacin [µg/kg TM]
64s	50	6	39,8
64b	50	6	134

Tabelle A 11: Kupfergehalte im Bodenwasser der Saugkerzengefäße

Tag	Cu in Probe [mg/L]	Probenvolumen [mL]	Entnommenes Kupfer [μ g]	Kupfergehalt [mg/Gefäß]	Wasser Gefäß [L]	Cu in Lösung im Gefäß [%]
1	0,18	11,0	1,95	0,20	0,66	58,5
	0,37	10,0	3,71	1,20	0,80	24,7
	0,91	12,0	11,0	3,20	0,64	18,3
	2,17	9,0	19,5	6,20	0,76	26,6
8	0,12	12,0	1,49	0,20	0,96	60,3
	0,40	12,5	5,02	1,20	0,92	30,9
	1,04	12,5	13,0	3,19	0,76	24,8
	1,03	12,5	12,9	6,18	0,92	15,3
15	0,18	12,5	2,23	0,20	0,90	81,8
	0,34	14,0	4,74	1,19	0,86	24,5
	0,79	11,5	9,03	3,18	0,74	18,3
	1,23	11,0	13,6	6,17	0,88	17,6
22	0,15	12,5	1,91	0,19	0,88	69,1
	0,37	12,5	4,61	1,19	0,84	26,1
	0,49	12,0	5,89	3,17	0,70	10,9
	1,04	12,5	13,0	6,15	0,84	14,2
29	0,14	11,0	1,57	0,19	0,86	63,6
	0,32	13,5	4,31	1,18	0,82	22,2
	0,36	12,5	4,54	3,16	0,68	7,8
	0,89	13,0	11,6	6,14	0,82	11,9

Tabelle A 12: Chemikalienverzeichnis

Chemikalie	Hersteller
Ameisensäure	98-100 % p.A., Applichem, Deutschland
Ameisensäure (MS-Grade)	for Mass Spectroscopy, Sigma Aldrich, D.
Ammoniaklösung	25 %, p.A., Roth, Deutschland
Ammoniumacetat	p.A. Applichem, Deutschland
Ammoniumheptamolybdat-tetrahydrat	Ph. Eur. Merck, Deutschland
Ascorbinsäure	p.A. Merck, Deutschland
Calciumacetat-hydrat	for soil testing, Merck, Deutschland
Calciumlactat-pentahydrat	Applichem, Deutschland
Chlortetracyclin	Vetranal, Sigma Aldrich, Deutschland
Ciprofloxacin	Vetranal, Sigma Aldrich, Deutschland
Citronensäure-monohydrat	Ph. Eur. Merck, Deutschland
Demeclocyclin	Vetranal, Sigma Aldrich, Deutschland
Difloxacin	Vetranal, Sigma Aldrich, Deutschland
Dinatrium-EDTA	Biochemica, Applichem, Deutschland
Enrofloxacin	Vetranal, Sigma Aldrich, Deutschland
Enrofloxacin	>98 %, Sigma Aldrich, Deutschland
Essigsäure	100 %, p.A., Applichem, Deutschland
Heptan	p.A., Sigma Aldrich, Deutschland
Kaliumantimon(III)oxidtartrat-hemihydrat	reinst, Merck, Deutschland
Kupfer-II-chlorid-dihydrat	p.A., Merck, Deutschland
Methacyclin	Vetranal, Sigma Aldrich, Deutschland
Methanol	HPLC-Grade, Applichem, Deutschland
Methanol (LC-MS)	LC-MS Grade, Applichem, Deutschland
Natriumcitrat-dihydrat	98 %, Sigma Aldrich, Deutschland
Norfloxacin	Vetranal, Sigma Aldrich, Deutschland
Ofloxacin	Vetranal, Sigma Aldrich, Deutschland
Oxytetracyclin	Vetranal, Sigma Aldrich, Deutschland
Salpetersäure	65 % p.A., Roth, Deutschland
Salzsäure	37 %, p.A., Roth, Deutschland
Schwefelsäure	p.A., Roth, Deutschland
Sulfadiazin	Vetranal, Sigma Aldrich, Deutschland
Sulfadiazin	>98 %, Fluka Analytical, Sigma Aldrich, D.
Sulfamethazin	Vetranal, Sigma Aldrich, Deutschland
Sulfamethoxazol	Vetranal, Sigma Aldrich, Deutschland
Tetracyclin	Vetranal, Sigma Aldrich, Deutschland
Tetracyclin	>98 % Sigma Aldrich, Deutschland

- Ajiboye, B., Akinremi, O., & Racz, G. (2004). Laboratory characterization of phosphorus in fresh and oven-dried organic amendments. *Journal of Environmental Quality*, 33(3), 1062-1069.
- Akinremi, O. O., Armisen, N., Kashem, M. A., & Janzen, H. H. (2003). Evaluation of Analytical Methods for Total Phosphorus in Organic Amendments. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 34(19-20), 2981-2991. doi:10.1081/css-120025220
- Al Seadi, T., & Lukehurst, C. (2012). *Quality management of digestate from biogas plants used as fertiliser*. Paper presented at the IEA Bioenergy, Task.
- Álvarez, J., Otero, L., Lema, J., & Omil, F. (2010). The effect and fate of antibiotics during the anaerobic digestion of pig manure. *Bioresour Technol*, 101(22), 8581-8586.
- Anonymous. (2003). VERORDNUNG (EG) Nr. 2003/2003 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 13. Oktober 2003 über Düngemittel.
- Anonymous. (2008a). Bestimmung von Phosphor und Kalium im Calcium-Acetat-Lactat-Auszug. *VDLUFA Methodenbuch II.2, 3.7.2.1*.
- Anonymous. (2008b). Verordnung (EG) Nr. 440/2008 der Kommission vom 30. Mai 2008 zur Festlegung von Prüfmethode gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH).
- Anonymous. (2009a). Düngegesetz 2009. vom 9. Januar 2009 (BGBl. I S. 54, 136), *Ausfertigung 2015 (BGBl. I S. 1474)*.
- Anonymous. (2009b). VERORDNUNG (EU) Nr.37/2010 DER KOMMISSION vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs.
- Anonymous. (2012a). OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS - Daphnia magna Reproduction Test.
- Anonymous. (2012b). Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures *SCHER, SCCS, SCENIH*. doi:10.2772/21444
- Anonymous. (2014). Hinweise zur Kennzeichnung von Gärresten aus Biogasanlagen gemäß den Anforderungen der Düngemittelverordnung (DüMV) vom 05.12.2012. *Landwirtschaftskammer Niedersachsen*.
- Anonymous. (2015a). Antibiotikaabgabe in der Tiermedizin sinkt weiter. *Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*.
- Anonymous. (2015b). Branchenzahlen 2015 und Prognose der Branchenentwicklung 2016, Fachverband Biogas eV.
- Anonymous. (2015c). Klärschlammverordnung vom 15. April 1992 (BGBl. I S. 912), die zuletzt durch Artikel 74 der Verordnung vom 31. August 2015 (BGBl. I S. 1474) geändert worden ist.
- Anonymous. (2015d). Phosphor - Löslichkeiten und Düngewirkung von Komposten. *HuMuss Land, No. 3, 6-7*.
- Anonymous. (2015e). Verordnung über das Inverkehrbringen von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln (Düngemittelverordnung - DüMV) Düngemittelverordnung vom 5. Dezember 2012 (BGBl. I S. 2482), die durch Artikel 1 der Verordnung vom 27. Mai 2015 (BGBl. I S. 886) geändert worden ist.
- Anonymous. (2016a). Abwasserbehandlung - Klärschlamm Ergebnisbericht, Statistisches Bundesamt.

- Anonymous. (2016b). *Berichte Zur Resistenzmonitoringstudie 2012/2013: Resistenzsituation Bei Klinisch Wichtigen Tierpathogenen Bakterien 2012/2013 Bundesamt für Verbraucherschutz*: Springer-Verlag.
- Anonymous. (2016c). Düngemittelversorgung. *Statistisches Bundesamt Fachserie 4 Reihe 8.2*.
- Anonymous. (2016d). GERMAP 2015 – Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. *Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V., Antiinfectives Intelligence, Rheinbach, 2016*.
- Arikan, O. A. (2008). Degradation and metabolization of chlortetracycline during the anaerobic digestion of manure from medicated calves. *Journal of Hazardous Materials, 158(2)*, 485-490.
- Badea, M. N., Diacu, E., & Radu, V. M. (2013). Influence of antibiotics on copper uptake by plants. *Revista de Chimie, 64(7)*, 684-687.
- Baguer, A. J., Jensen, J., & Krogh, P. H. (2000). Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna. *Chemosphere, 40(7)*, 751-757.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol., 57*, 233-266.
- Bangert, K. (2005). *Herstellung und Charakterisierung von Calciumorthophosphaten für die Anwendung als Knochenersatzwerkstoffe*. Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg.
- Boxall, A. B. A., Johnson, P., SMITH, E. J., & CHRIS J. SINCLAIR, E. S., # AND LEN S. LEVY. (2006). Uptake of Veterinary Medicines from Soils into Plants. *J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 2288-2297, 54, 2288-2297*.
- Breitinger, H.-G. (2012). Drug synergy—mechanisms and methods of analysis. *Toxicity and Drug Testing, 143-166*.
- Bundesgütegemeinschaft Kompost e.V. (1998). Methodenbuch zur Analyse von Kompost. *Verlag Abfall Now e. V., Stuttgart, 4. Auflage, 38-39*.
- Campbell, C. G., Borglin, S. E., Green, F. B., Grayson, A., Wozel, E., & Stringfellow, W. T. (2006). Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: a review. *Chemosphere, 65(8)*, 1265-1280.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Llompard, M. a., García-Jares, C., Rodríguez, I., . . . Ternes, T. (2004). Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res, 38(12)*, 2918-2926.
- Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P., & Phillips, I. (2003). The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of antimicrobial chemotherapy, 52(2)*, 159-161.
- Cetecioglu, Z., Ince, B., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Barcelo, D., Orhon, D., & Ince, O. (2013). Chronic impact of tetracycline on the biodegradation of an organic substrate mixture under anaerobic conditions. *Water Res, 47(9)*, 2959-2969. doi:10.1016/j.watres.2013.02.053
- Chessa, L., Jechalke, S., Ding, G.-C., Pusino, A., Mangia, N. P., & Smalla, K. (2016). The presence of tetracycline in cow manure changes the impact of repeated manure application on soil bacterial communities. *Biology and Fertility of Soils, 52(8)*, 1121-1134.
- Christensen, A. M., Ingerslev, F., & Baun, A. (2006). Ecotoxicity of mixtures of antibiotics used in aquacultures. *Environmental Toxicology and Chemistry, 25(8)*, 2208-2215.

- Christian, T., Schneider, R., & Goldbach, H. E. (2005). Untersuchungen zum Eintrag von Antibiotika und natürlichen endokrinen Disruptoren nach Gülleausbringung in Gewässer Nordrhein-Westfalens. *Schriftenreihe des Lehr-und Forschungsschwerpunktes USL*, 138.
- Christian, T., Schneider, R. J., Färber, H. A., Skutlarek, D., Meyer, M. T., & Goldbach, H. E. (2003). Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 31(1), 36-44.
- Conley, D. J., Paerl, H. W., Howarth, R. W., Boesch, D. F., Seitzinger, S. P., Karl, E., . . . Gene, E. (2009). Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. *Science*, 123, 1014-1015.
- Costanzo, S. D., Murby, J., & Bates, J. (2005). Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin*, 51(1), 218-223.
- Cottier, H. (2013). *Pathogenese: ein Handbuch für die ärztliche Fortbildung* (Vol. 1): Springer-Verlag.
- Dalla Bona, M., Di Leva, V., & De Liguoro, M. (2014). The sensitivity of *Daphnia magna* and *Daphnia curvirostris* to 10 veterinary antibacterials and to some of their binary mixtures. *Chemosphere*, 115, 67-74. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.02.003
- Dalla Bona, M., Zounkova, R., Merlanti, R., Blaha, L., & De Liguoro, M. (2015). Effects of enrofloxacin, ciprofloxacin, and trimethoprim on two generations of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 113, 152-158. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.11.018
- Déry, P., & Anderson, B. (2007). Peak phosphorus. *Energy Bulletin*, 13.
- Ding, C., & He, J. (2010). Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87(3), 925-941. doi:10.1007/s00253-010-2649-5
- Dolliver, H., Kumar, K., & Gupta, S. (2007). Sulfamethazine uptake by plants from manure-amended soil. *Journal of Environmental Quality*, 36(4), 1224-1230.
- Eguchi, K., Nagase, H., Ozawa, M., Endoh, Y. S., Goto, K., Hirata, K., . . . Yoshimura, H. (2004). Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere*, 57(11), 1733-1738.
- Erickson, R. J., Benoit, D. A., Mattson, V. R., Leonard, E. N., & Nelson, H. P. (1996). The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(2), 181-193.
- Fargašová, A. (2001). Phytotoxic effects of Cd, Zn, Pb, Cu and Fe on *Sinapis alba* L. seedlings and their accumulation in roots and shoots. *Biologia plantarum*, 44(3), 471-473.
- Fargašová, A. (2004). Toxicity comparison of some possible toxic metals (Cd, Cu, Pb, Se, Zn) on young seedlings of *Sinapis alba*. *L. Plant Soil Environ*, 50(1), 33-38.
- Finck, A. (1952). Ökologische und bodenkundliche Studien über die Leistungen der Regenwürmer für die Bodenfruchtbarkeit. *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde*, 58(2), 120-145.
- Flemming, C., & Trevors, J. (1989). Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, Air, and Soil Pollution*, 44(1-2), 143-158.
- Fliessbach, A., Martens, R., & Reber, H. (1994). Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(9), 1201-1205.
- Gao, M., Zhou, Q., Song, W., & Ma, X. (2014). Combined effects of oxytetracycline and Pb on earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 37(2), 689-696.

- Gardolinski, P. C., Hanrahan, G., Achterberg, E. P., Gledhill, M., Tappin, A. D., House, W. A., & Worsfold, P. J. (2001). Comparison of sample storage protocols for the determination of nutrients in natural waters. *Water Res*, 35(15), 3670-3678.
- Gavalchin, J., & Katz, S. E. (1994). The persistence of fecal-borne antibiotics in soil. *Journal of AOAC international*, 77(2), 481-485.
- Gioelli, F., Dinuccio, E., & Balsari, P. (2011). Residual biogas potential from the storage tanks of non-separated digestate and digested liquid fraction. *Bioresour Technol*, 102(22), 10248-10251.
- González-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Leganés, F., Rosal, R., Boltes, K., . . . Fernández-Piñas, F. (2013). Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: implications for environmental risk assessment. *Water Res*, 47(6), 2050-2064.
- Greaves, J., Hobbs, P., Chadwick, D., & Haygarth, P. (1999). Prospects for the recovery of phosphorus from animal manures: a review. *Environmental Technology*, 20(7), 697-708.
- Güngör, K., & Karthikeyan, K. G. (2008). Phosphorus forms and extractability in dairy manure: a case study for Wisconsin on-farm anaerobic digesters. *Bioresour Technol*, 99(2), 425-436. doi:10.1016/j.biortech.2006.11.049
- Haber, N., Kluge, R., Wagner, W., Mokry, M., Dederer, M., & Messner, J. (2008). Inhaltsstoffe von Gärprodukten und Möglichkeiten zu ihrer geordneten pflanzenbaulichen Verwertung. *Landwirtschaftliches technologiezentrum Augustenberg, Deutschland*.
- Halling-Sørensen, B., Nielsen, S. N., Lanzky, P., Ingerslev, F., Lützhøft, H. H., & Jørgensen, S. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-A review. *Chemosphere*, 36(2), 357-393.
- Halling-Sørensen, B., Sengeløv, G., Ingerslev, F., & Jensen, L. B. (2003). Reduced antimicrobial potencies of oxytetracycline, tylosin, sulfadiazin, streptomycin, ciprofloxacin, and olaquinox due to environmental processes. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 44(1), 0007-0016.
- Halling Sørensen, B. (2000). Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere*, 40(7), 731-739.
- Hamscher, G., Pawelzick, H. T., Höper, H., & Nau, H. (2003). Tierarzneimittelrückstände in Wirtschaftsdüngern, Boden, Sicker- und Grundwasser. *Spurenstoffe in Gewässern: Pharmazeutische Reststoffe und endokrin wirksame Substanzen*, 107-122.
- Hamscher, G., Pawelzick, H. T., Höper, H., & Nau, H. (2005). Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(4), 861-868.
- Hamscher, G., Sczesny, S., Höper, H., & Nau, H. (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(7), 1509-1518.
- Haneklaus, S., Schick, J., Kratz, S., Rückamp, D., & Schnug, E. (2016). Variable rate application of manure—gain or pain? *Appl Agric Forestry Res*, 1(66), 11-20. doi:DOI:10.3220/LBF1458735160000
- Hensel, A. (2006). Landwirtschaftliche Verwertung von Wirtschaftsdüngern und Sekundärrohstoffdüngern-Hygienische und toxikologische Risiken. *KTBL SCHRIFT*, 444, 51 - 61.
- Heuer, H., Focks, A., Lamshöft, M., Smalla, K., Matthies, M., & Spiteller, M. (2008). Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the

- dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(7), 1892-1900.
- Heuer, H., & Smalla, K. (2007). Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environmental microbiology*, 9(3), 657-666.
- Heuer, H., Solehati, Q., Zimmerling, U., Kleinedam, K., Schloter, M., Müller, T., . . . Smalla, K. (2011). Accumulation of sulfonamide resistance genes in arable soils due to repeated application of manure containing sulfadiazine. *Appl Environ Microbiol*, 77(7), 2527-2530.
- Hölzel, C. S., Harms, K. S., Kuchenhoff, H., Kunz, A., Müller, C., Meyer, K., . . . Bauer, J. (2010). Phenotypic and genotypic bacterial antimicrobial resistance in liquid pig manure is variously associated with contents of tetracyclines and sulfonamides. *J Appl Microbiol*, 108(5), 1642-1656. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04570.x
- Insam, H., Gómez-Brandón, M., & Ascher, J. (2015). Manure-based biogas fermentation residues—Friend or foe of soil fertility? *Soil Biology and Biochemistry*, 84, 1-14.
- Jacobsen, A. M., & Halling-Sorensen, B. (2006). Multi-component analysis of tetracyclines, sulfonamides and tylosin in swine manure by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 384(5), 1164-1174. doi:10.1007/s00216-005-0261-9
- Kallistratos, G. (1964). Auflösung von schwerlöslichen Phosphaten durch Säuren und Komplexbildner. *Der Urologe*, 3(4), 218-222.
- Kaltschmitt, M., Hartmann, H., & Hofbauer, H. (2009). Energie aus Biomasse (pp. 918-923): Springer-Heidelberg.
- Kang, D. H., Gupta, S., Rosen, C., Fritz, V., Singh, A., Chander, Y., . . . Rohwer, C. (2013). Antibiotic uptake by vegetable crops from manure-applied soils. *J Agric Food Chem*, 61(42), 9992-10001. doi:10.1021/jf404045m
- Kay, P., Blackwell, P. A., & Boxall, A. (2004). Fate of veterinary antibiotics in a macroporous tile drained clay soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(5), 1136-1144.
- Kay, P., Blackwell, P. A., & Boxall, A. B. (2005). Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land. *Chemosphere*, 59(7), 951-959.
- Kemper, N., Färber, H., Skutlarek, D., & Krieter, J. (2008). Analysis of antibiotic residues in liquid manure and leachate of dairy farms in Northern Germany. *Agricultural Water Management*, 95(11), 1288-1292. doi:10.1016/j.agwat.2008.05.008
- Khalil, M. A., Abdel-Lateif, H. M., Bayoumi, B. M., & van Straalen, N. M. (1996). Analysis of separate and combined effects of heavy metals on the growth of *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta; Annelida), using the toxic unit approach. *Applied Soil Ecology*, 4(3), 213-219.
- Kleinman, P. J., Wolf, A. M., Sharpley, A. N., Beegle, D. B., & Saporito, L. S. (2005). Survey of water-extractable phosphorus in livestock manures. *Soil Science Society of America Journal*, 69(3), 701-708.
- Knapp, C. W., Engemann, C. A., Hanson, M. L., Keen, P. L., Hall, K. J., & Graham, D. W. (2008). Indirect evidence of transposon-mediated selection of antibiotic resistance genes in aquatic systems at low-level oxytetracycline exposures. *Environmental science & technology*, 42(14), 5348-5353.
- Kolbe, H. (2009). Standarduntersuchungsprogramm zu Bodenfruchtbarkeit und Nährstoffmanagement.

- Kong, W., Zhu, Y., Liang, Y., Zhang, J., Smith, F., & Yang, M. (2007). Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental Pollution*, 147(1), 187-193.
- Koutsoukos, P., Amjad, Z., Tomson, M., & Nancollas, G. (1980). Crystallization of calcium phosphates. A constant composition study. *Journal of the American Chemical Society*, 102(5), 1553-1557.
- Kowalenko, C. G., & Babuin, D. (2007). Interference Problems with Phosphoantimonymolybdenum Colorimetric Measurement of Phosphorus in Soil and Plant Materials. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38(9-10), 1299-1316. doi:10.1080/00103620701328594
- Kratz, S., Haneklaus, S., & Schnug, E. (2010). Chemical solubility and agricultural performance of P-containing recycling fertilizers. *Landbauforschung Völkenrode*, 60(4), 227-240.
- Kratz, S., & Schnug, E. (2005). Schwermetalle in P-Düngern. *Landbauforschung Völkenrode, Special*, 286, 37-45.
- Kratz, S., & Schnug, E. (2006). Rock phosphates and P fertilizers as sources of U contamination in agricultural soils *Uranium in the environment* (pp. 57-67): Springer.
- Kratz, S., & Schnug, E. (2008). *Agronomische Bewertung von Phosphat-Düngern*. Paper presented at the Vortrag zum Symposium „Ressourcen schonender Einsatz von Phosphor in der“.
- Kratz, S., & Schnug, E. (2009). Zur Frage der Löslichkeit und Pflanzenverfügbarkeit von Phosphor in Düngemitteln. *Journal für Kulturpflanzen*, 61 (1), S. 2–8.
- Kreuzig, R., & Höltge, S. (2005). Investigations on the fate of sulfadiazine in manured soil: laboratory experiments and test plot studies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(4), 771-776.
- Kumar, K., Gupta, S. C., Chander, Y., & Singh, A. K. (2005). Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Advances in agronomy*, 87, 1-54.
- Lebuhn, M., Wilken, D., Knabe, M., & Ostertag, J. (2016). Empfehlungen für eine gute fachliche Praxis in landwirtschaftlichen Biogasanlagen aus hygienischer Sicht. *Biogas Forum Bayern III – 8/2016 (3. Auflage)*.
- Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*, 10, S122-S129.
- Li, W., Khan, M. A., Yamaguchi, S., & Kamiya, Y. (2005). Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant growth regulation*, 46(1), 45-50.
- Li, Y., Zhang, X.-l., Li, W., Lu, X.-f., Liu, B., & Wang, J. (2013). The residues and environmental risks of multiple veterinary antibiotics in animal faeces. *Environmental monitoring and assessment*, 185(3), 2211-2220.
- Liang, J., & Zhou, Q. (2003). Single and binary-combined toxicity of methamidophos, acetochlor and copper acting on earthworms *Eisenia foelide*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 71(6), 1158-1166.
- Liu, F., Ying, G.-G., Tao, R., Zhao, J.-L., Yang, J.-F., & Zhao, L.-F. (2009). Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environmental Pollution*, 157(5), 1636-1642.
- Martens, R., Wetzstein, H.-G., Zadrazil, F., Capelari, M., Hoffmann, P., & Schmeer, N. (1996). Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by wood-rotting fungi. *Appl Environ Microbiol*, 62(11), 4206-4209.
- Martin, J., Santos, J. L., Aparicio, I., & Alonso, E. (2014). Pharmaceutically active compounds in sludge stabilization treatments: Anaerobic and aerobic

- digestion, wastewater stabilization ponds and composting. *Sci Total Environ.* doi:10.1016/j.scitotenv.2014.05.089
- Martinez, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, 157(11), 2893-2902.
- Massé, D., Saady, N., & Gilbert, Y. (2014). Potential of Biological Processes to Eliminate Antibiotics in Livestock Manure: An Overview. *Animals*, 4(2), 146-163. doi:10.3390/ani4020146
- Matula, J. (2010). Differences in available phosphorus evaluated by soil tests in relation to detection by colorimetric and ICP-AES techniques. *Plant Soil Environ*, 56(6), 297-304.
- McDowell, R. W., & Sharpley, A. N. (2001). Soil phosphorus fractions in solution: Influence of fertiliser and manure, filtration and method of determination. *Chemosphere*, 45(6), 737-748.
- McKelvie, I. D., Hart, B., Cardwell, T., & Cattrall, R. (1993). Speciation of dissolved phosphorus in environmental samples by gel filtration and flow-injection analysis. *Talanta*, 40(12), 1981-1993.
- McKelvie, I. D., Peat, D. M., & Worsfold, P. J. (1995). *Analytical perspective. Techniques for the quantification and speciation of phosphorus in natural waters*. Paper presented at the Analytical Proceedings Including Analytical Communications.
- McLaren, R., & WILLIAMS, J. (1981). The adsorption of copper by soil materials at low equilibrium solution concentrations. *Journal of Soil Science*, 32(2), 247-256.
- Messelhäußer, U. (2015). *Clostridium botulinum: Band I: Vorkommen, Bedeutung und Erkrankungsformen*: Behr's Verlag DE.
- Michelini, L., La Rocca, N., Rascio, N., & Ghisi, R. (2013). Structural and functional alterations induced by two sulfonamide antibiotics on barley plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 67, 55-62.
- Michelini, L., Reichel, R., Werner, W., Ghisi, R., & Thiele-Bruhn, S. (2012). Sulfadiazine uptake and effects on *Salix fragilis* L. and *Zea mays* L. plants. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(8), 5243-5257.
- Migliore, L., Cozzolino, S., & Fiori, M. (2003). Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere*, 52(7), 1233-1244. doi:10.1016/s0045-6535(03)00272-8
- Mitchell, S. M., Ullman, J. L., Teel, A. L., Watts, R. J., & Frear, C. (2013). The effects of the antibiotics ampicillin, florfenicol, sulfamethazine, and tylosin on biogas production and their degradation efficiency during anaerobic digestion. *Bioresour Technol*, 149, 244-252. doi:10.1016/j.biortech.2013.09.048
- Möller, K., & Müller, T. (2012). Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: A review. *Engineering in Life Sciences*, 12(3), 242-257. doi:10.1002/elsc.201100085
- Möller, K., Schulz, R., Müller, T., Deupmann, H., & Vogel, A. (2009). Mit Gärresten richtig Düngen—Aktuelle Informationen für Berater. Institut für Pflanzenernährung, Universität Hohenheim. *Zusammenarbeit mit E. ON Bioerdgas GmbH und E. ON Ruhrgas AG*.
- Montag, D., Everding, W., Malms, S., & Pinnekamp, J. (2015). Bewertung konkreter Maßnahmen einer weitergehenden Phosphorrückgewinnung aus relevanten Stoffströmen sowie zum effizienten Phosphoreinsatz *TEXTE 98/2015 Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit*.

- Morales-Muñoz, S., Luque-García, J., & De Castro, M. L. (2004). Continuous microwave-assisted extraction coupled with derivatization and fluorimetric monitoring for the determination of fluoroquinolone antibacterial agents from soil samples. *Journal of Chromatography A*, 1059(1), 25-31.
- Müller, C. (2006). Schwermetalle und Spurenelemente in Gülle. *Schweinegülle—Quelle für potentiell unerwünschte Stoffe (Boden, Wasser, Pflanze)?*, 29 - 36.
- Nagajyoti, P., Lee, K., & Sreekanth, T. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 199-216.
- Nathan, M., Mallarino, A., Eliason, R., & Miller, R. (2002). ICP vs. colorimetric determination of Mehlich III extractable phosphorus. *Commun. Soil Sci. Plant Anal*, 33, 2432-2433.
- Newsely, H. (1960). Darstellung von "Oktacalciumphosphat"(Tetracalciumhydrogentrisphosphat) durch homogene Kristallisation. *Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften*, 91(6), 1020-1023.
- Nicolardot, D., Cheneby, B., & Allard, M. R. (1992). Availability of Carbon and Nitrogen contained in different soil particle-size fractions
Humus, its Structure and Role in Agriculture and Environment, 25, 107.
- Norman, A. (1955). Terramycin and plant growth. *Agronomy Journal*, 47(12), 585-587.
- Ouzounidou, G. (1995). Effect of copper on germination and seedling growth of *Minuartia*, *Silene*, *Alyssum* and *Thlaspi*. *Biologia plantarum*, 37(3), 411-416.
- Paulsen, H. M., Kratz, S., & Schnug, E. (2011). Nährstoffgehalte ökologischer Wirtschaftsdünger.
- Paz-Ferreiro, J., Vázquez, E. V., & de Abreu, C. A. (2012). Phosphorus determination after Mehlich 3 extraction and anion exchange resin in an agricultural soil of Northwestern Spain. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 43(1-2), 102-111.
- Phillips, D. J. (1977). The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments—a review. *Environmental Pollution (1970)*, 13(4), 281-317.
- Pittman, J., Zhang, H., Schroder, J., & Payton, M. (2005). Differences of phosphorus in Mehlich 3 extracts determined by colorimetric and spectroscopic methods. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 36(11-12), 1641-1659.
- Ratsak, C., Guhl, B., Zühlke, S., & Delschen, T. (2013). Veterinary antibiotic residues in manure and digestates in Northrhine-Westfalia. *Environmental Sciences Europe*, 25(7).
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., & Boxall, A. B. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65(5), 725-759.
- Schanz, A. (2006). Vortrag Biologie und Ökologie von *Daphnia*.
- Schedl, D. (2000). *Ein Beitrag zur Risikobewertung von Tetracyclin-Rückständen in Lebensmitteln: Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit von Chlortetracyclin, Doxycyclin, Oxytetracyclin und Tetracyclin gegenüber humaner Darmflora und zur Resistenzinduktion bei E. coli durch Anhydrotetracyclin und 4-Epi-Tetracyclin.*
- Scheffer, E., Schachtschabel, P. (1998a). Lehrbuch der Bodenkunde. *Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart*, 14., neu bearbeitete und erweiterte Auflage.
- Scheffer, E., Schachtschabel, P. (1998b). Lehrbuch der Bodenkunde. *Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart*, 14., neu bearbeitete und erweiterte Auflage, S. 263.

- Scheffelowitz, M., Daniel-Gromke, J., Rensberg, N., Denysenko, V., Hillebrand, K., Naumann, K., . . . Beyrich, W. (2015). Stromerzeugung aus Biomasse (Vorhaben Ila Biomasse) Zwischenbericht Juni 2015. *DBFZ, Leipzig*.
- Schnug, E., & Haneklaus, N. (2015). Uranium in phosphate fertilizers—review and outlook *Uranium-Past and Future Challenges* (pp. 123-130): Springer.
- Schnug, E., Sparovek, R., Storck, W., Jering, A., & Volkgenannt, U. (2001). The HELCOM Working Group on Agriculture (WGA). *Landbauforschung Völkenrode*, 51(1/2), 5-10.
- Schüller, H. (1969). Die CAL-Methode, eine neue Methode zur Bestimmung des pflanzenverfügbaren Phosphates in Böden. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 123(1), 48-63.
- Sikora, F., Howe, P., Hill, L., Reid, D., & Harover, D. (2005). Comparison of colorimetric and ICP determination of phosphorus in Mehlich3 soil extracts. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 36(7-8), 875-887.
- Sittig, S., Kasteel, R., Groeneweg, J., Hofmann, D., Thiele, B., Koppchen, S., & Vereecken, H. (2014). Dynamics of transformation of the veterinary antibiotic sulfadiazine in two soils. *Chemosphere*, 95, 470-477. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.09.100
- Sorvari, J., & Sillanpää, M. (1996). Influence of metal complex formation on heavy metal and free EDTA and DTPA acute toxicity determined by *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 33(6), 1119-1127.
- Spielmeyer, A., Breier, B., Großmeier, K., & Hamscher, G. (2015). Elimination patterns of worldwide used sulfonamides and tetracyclines during anaerobic fermentation. *Bioresour Technol*, 193, 307-314.
- Sturini, M., Speltini, A., Maraschi, F., Profumo, A., Pretali, L., Fasani, E., & Albin, A. (2012). Sunlight-induced degradation of soil-adsorbed veterinary antimicrobials marbofloxacin and enrofloxacin. *Chemosphere*, 86(2), 130-137.
- Tallarida, R. J. (2006). An overview of drug combination analysis with isobolograms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319(1), 1-7.
- Thiele-Bruhn, S. (2003). Pharmaceutical antibiotic compounds in soils—a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 166(2), 145-167.
- Turker, G., Ince, O., Ertekin, E., Akyol, C., & Ince, B. (2013). Changes in performance and active microbial communities due to single and multiple effects of mixing and solid content in anaerobic digestion process of OTC medicated cattle manure. *International Journal of Renewable Energy Research (IJRER)*, 3(1), 144-148.
- Vaz, M. R., Edwards, A., Shand, C., & Cresser, M. (1992). Determination of dissolved organic phosphorus in soil solutions by an improved automated photo-oxidation procedure. *Talanta*, 39(11), 1479-1487.
- VDLUFÄ. (1995a). Bestimmung des Wasser und Neutralammoniumcitrat-löslichen Phosphats nach Fresenius Neubauer. *Methodenbuch II*, 4.1.4.
- VDLUFÄ. (1995b). Bestimmung des wasserlöslichen Phosphats. *Methodenbuch II*, 4.1.7.
- VDLUFÄ. (2000a). Bestimmung des Gesamtposphates Aufschluss mit Königswasser. *VDLUFÄ Methodenbuch II.2*, 3.2.1.3.
- VDLUFÄ. (2000b). Die Untersuchung von Sekundärrohstoffdüngern, Kultursubstraten und Bodenhilfsstoffen. *VDLUFÄ Methodenbuch II.2*, VDLUFÄ-Verlag, Darmstadt, 3.2.1.3, 10.
- Wacha, H., Hoyme, U., Isenmann, R., Kujath, P., Lebert, C., Naber, K., & Salzberger, B. (2010). Perioperative antibiotika-prophylaxe. *Chemother J*, 19, 70-84.
- Waida, C., Kehres, B. (2014). Phosphat - Löslichkeit. *H&K aktuell*, 10, 1-4.

- Walter, R., Burmeister, J., & für Landwirtschaft, B. L. (2012). Effekte der Gärrestdüngung auf Bodentiere–Zwischenbilanz. *Düngung mit Biogasgärresten*, 31-47.
- Weltje, L. (1998). Mixture toxicity and tissue interactions of Cd, Cu, Pb and Zn in earthworms (*Oligochaeta*) in laboratory and field soils: a critical evaluation of data. *Chemosphere*, 36(12), 2643-2660.
- Wendland, M., & Lichti, F. (2012). Biogasgärreste - Einsatz von Gärresten aus der Biogasproduktion als Düngemittel. *Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft Institut für Agrarökologie, Ökologischen Landbau und Bodenschutz, Nr. 1–3/2012*.
- Widyasari-Mehta, A., Hartung, S., & Kreuzig, R. (2016). From the application of antibiotics to antibiotic residues in liquid manures and digestates: A screening study in one European center of conventional pig husbandry. *Journal of environmental management*, 177, 129-137.
- Wolf, A. M., Kleinman, P. J. A., Sharpley, A. N., & Beegle, D. B. (2005). Development of a Water-Extractable Phosphorus Test for Manure. *Soil Science Society of America Journal*, 69(3), 695. doi:10.2136/sssaj2004.0096
- Worsfold, P. J., Gimbert, L. J., Mankasingh, U., Omaka, O. N., Hanrahan, G., Gardolinski, P. C., . . . McKelvie, I. D. (2005). Sampling, sample treatment and quality assurance issues for the determination of phosphorus species in natural waters and soils. *Talanta*, 66(2), 273-293. doi:10.1016/j.talanta.2004.09.006
- Zhang, Y., Wang, X., Yin, X., Shi, M., Dahlgren, R. A., & Wang, H. (2014). Toxicity assessment of combined fluoroquinolone and tetracycline exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology*.
- Zirkler, D., Peters, A., & Kaupenjohann, M. (2014). Elemental composition of biogas residues: Variability and alteration during anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy*, 67, 89-98. doi:10.1016/j.biombioe.2014.04.021

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der Probenahme der Biogasanlage für die Phosphoranalytik.	15
Abbildung 2: Schema der verschiedenen Probenaufarbeitungen für die Phosphoranalytik	16
Abbildung 3: Chromatogramme eines mit Tetracyclin gespikten Gärrest-Extrakts, links im EMS-Modus (240 – 500 m/z), rechts im MRM-Modus: Epi-Tetracyclin und Tetracyclin (445/410, 445/427, 445/154 m/z)	25
Abbildung 4: Chromatogramm eines gespikten Gärrests (SD: Sulfadiazin, SM: Sulfamethazin, SMZ: Sulfamethoxazol, DMC: Demeclocyclin, TC: Tetracyclin, OTC: Oxytetracyclin, CTC: Chlortetracyclin, MTC: Methacyclin, CP: Ciprofloxacin, DF: Difloxacin, EN: Enrofloxacin, NF: Norfloxacin, OF: Ofloxacin).....	26
Abbildung 5: <i>Daphnia magna</i> unter dem Mikroskop	31
Abbildung 6: Testplatte des Daphtoxkit F; linke Reihe Transfervertiefungen, rechts je vier Vertiefungen für Test; X: Reihe für Kontrolle, 1 – 5: Reihen für verschiedene Konzentrationen der Testsubstanz	32
Abbildung 7: Phytotest mit <i>Sinapis alba</i> , Kontrolle in Citronensäurepuffer (pH 6) nach 5 Tagen	34
Abbildung 8: Aufbau des Hydrokulturversuchs (links), Schwimmplattform für den Hydrokulturversuch (rechts).....	37
Abbildung 9: Wasserlösliches P [mg/kg TM] in Hähnchenkot (links) und Vollgärrest (rechts), bei verschiedenen Probenvorbereitungen (ICP-Messung); Tukey-Kramer LSD _{5%} , unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede	46
Abbildung 10: CAL-lösliches P [mg/kg TM] in Hähnchenkot (links) und Vollgärrest (rechts), bei verschiedenen Probenaufbereitungen (ICP-Messung); Tukey-Kramer LSD _{5%} , unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede	49
Abbildung 11: Vergleich der Wurzellängen von <i>Sinapis alba</i> im Phytotestkit nach 5 Tagen, links Kontrolle, rechts Tetracyclin 300 mg/L	66
Abbildung 12: Reduktion der Wurzellänge von <i>Sinapis alba</i> im Phytotoxtest bei verschiedenen Konzentrationen von Enrofloxacin, Sulfadiazin, Tetracyclin und Kupfer nach 5 Tagen.....	67

Abbildung 13: Darstellung eines Isobogramms, verändert nach Breitinger (2012) .	69
Abbildung 14: Isobogramme (EC ₇₀ , Inhibierung des Wurzelwachstums von <i>Sinapis alba</i> nach 5 Tagen) der Kombinationen aus Enrofloxacin und Sulfadiazin, Enrofloxacin und Tetracyclin und Sulfadiazin und Tetracyclin	70
Abbildung 15: Effekte von Enrofloxacin und Kupfer auf <i>Sinapis alba</i> im Hydrokulturversuch bei verschiedenen Konzentrationen ([mg/L; EN=Enrofloxacin, Cu=Kupfer, nach 6 Tagen)	71
Abbildung 16: Effekt des Kupfers auf das Wurzelwachstum von <i>Sinapis alba</i> im Hydrokulturversuch ([mg/L; links Kontrolle, Cu=Kupfer, EN=Enrofloxacin)	72
Abbildung 17: Durchschnittliche Wurzellänge und Frischgewicht pro Gefäß von <i>Sinapis alba</i> Pflanzen in Abhängigkeit von der Kupferkonzentration in Hydrokultur nach 24 Tagen	73
Abbildung 18: Einfluss von Enrofloxacin auf <i>Sinapis alba</i> nach 11 Tagen; links Kontrolle, rechts Enrofloxacin 50 mg/Gefäß	73
Abbildung 19: Anteil des im Bodenwasser gelösten Kupfers von der Gesamtkupfermenge in Gefäßen mit unterschiedlichen Konzentrationen an verschiedenen Versuchstagen	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Substrate der beprobten Anlagen aus Finnland, Schweden und Deutschland (pflanzliche Substrate sind nicht aufgeführt)	14
Tabelle 2: Lösliche Phosphorfraktionen verschiedener Extraktionsmittel (verändert nach Kratz und Schnug 2009).....	17
Tabelle 3: Prozentuale Wiederfindungsraten der Antibiotika und internen Standards bei verschiedenen Konzentrationen in einem gespikten Gärrest und Hähnchenkot (WF: Wiederfindungsrate [%], SD: Standardabweichung) ..	24
Tabelle 4: Retentionszeiten der Analyten und internen Standards (inklusive ihrer Epimere)	27
Tabelle 5: LC-Gradient für die Bestimmung von Antibiotika in Probenextrakten; (Fließmittel A: Wasser + 77,08 mg/L Ammoniumacetat + 0,1 % Ameisensäure (MS-Grade); Fließmittel B: Methanol (LC-MS Grade) + 0,1 % Ameisensäure).....	27
Tabelle 6: Überblick über die unteren Bestimmungsgrenzen verschiedener Probenextrakte der Antibiotikaanalytik.....	28
Tabelle 7: Getestete Konzentrationen der Substanzen bei den Daphtoxkits	33
Tabelle 8: Getestete Konzentrationen der Substanzen bei den Phytotestkits mit <i>Sinapis alba</i>	35
Tabelle 9: Verwendete Konzentrationen von Antibiotika und Kupfer bei den Kombinationsversuchen in Phytotestkits mit <i>Sinapis alba</i>	35
Tabelle 10: Stammlösungen der Hoagland-Lösung welche in der Hydrokultur verwendet wurde.....	36
Tabelle 11: Enrofloxacin- und Kupferkonzentrationen im Hydrokulturversuch mit <i>Sinapis alba</i>	37
Tabelle 12: Grunddüngung des Sandgefäßversuchs mit <i>Sinapis alba</i>	39
Tabelle 13: Kupfer- und Enrofloxacinkonzentrationen im Versuchsaufbau mit <i>Sinapis alba</i>	40
Tabelle 14: Enrofloxacin- und Kupferkonzentrationen in Gefäßen mit Saugkerzen...41	
Tabelle 15: Wasserlösliche P-Gehalte [mg/kg TM] von Eingangssubstraten, Prozessschritten und Endprodukten einer Biogasanlage (ICP-Messwerte), bei verschiedenen Probenaufarbeitungen	47

Tabelle 16: CAL-lösliche P-Gehalte [mg/kg TM] von Eingangssubstraten, Prozessschritten und Endprodukten einer Biogasanlage (ICP-Messwerte), bei verschiedenen Probenaufarbeitungen	50
Tabelle 17: Vergleich der kolorimetrischen mit der ICP-OES-Messung von Wasser- und CAL-Extrakten; (Tukey-Kramer LSD _{5%}) 1-faktoriell über alle Varianten, (n=32; für Wasser und CAL getrennt)	52
Tabelle 18: Prozentualer Anteil der extrahierten P-Fractionen am Gesamt-P-Gehalt (getrocknetes gemahlene Material)	53
Tabelle 19: Vergleich Wasserextrakt mit CAL und NAC für die Variante 40 °C getrocknet und vermahlen (Vergleich über alle 8 Probenmaterialien; n=32; Tukey-Kramer LSD _{5%}).....	54
Tabelle 20: Häufigkeit der Kontamination der Eingangssubstrate (* Werte über der Nachweis- (LOD), aber unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ)).....	55
Tabelle 21: Mediane der Antibiotikagehalte der Eingangssubstrate nach Tierart und deren Häufigkeit [µg/kg TM] (Mediane aus Werten über dem LOQ)	56
Tabelle 22: Mediane der Antibiotikagehalte der 43 untersuchten Eingangssubstrate [µg/kg TM] (Mediane aus Werten über dem LOQ)	57
Tabelle 23: Häufigkeit der Kontamination der Endprodukte (* Werte über der Nachweis- (LOD), aber unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ)).....	57
Tabelle 24: Mediane der Antibiotikagehalte der Endprodukte nach Tierart und deren Häufigkeit [µg/kg TM] (Mediane aus Werten über dem LOQ)	59
Tabelle 25: Mediane der Antibiotikagehalte der 44 untersuchten Endprodukte [µg/kg TM].....	60
Tabelle 26: Anzahl der belasteten Proben sortiert nach Herkunftsland und Art der Eingangssubstrate (Tierart der Gülle) und Endprodukte	61
Tabelle 27: Mediane der Eingangssubstrate und Endprodukte nach Herkunftsland [µg/kg TM].....	63
Tabelle 28: Effektkonzentrationen der getesteten Substanzen auf <i>Daphnia magna</i> im Daphtoxkit F™ Magna	65
Tabelle 29: Berechnete Effektkonzentrationen der Reduktion der Wurzellänge und Reduktion der Wurzellänge von <i>Sinapis alba</i> bei 150 mg/L.....	68
Tabelle 30: Auswertung des Gefäßversuchs mit Enrofloxacin und Kupfer, Anzahl der Pflanzen pro Gefäß und Trockenmasse [g Pflanzenmaterial/Gefäß] (zugehörige Frischmassen finden sich im Anhang in Tabelle A 5).....	75

Tabelle 31: Statistische Auswertung des Gefäßversuchs mit Enrofloxacin und Kupfer, LSD _{5%} Test mit dem Programm Costat von Cohort	76
Tabelle 32: Extrahierbare Enrofloxacingehalte in unterschiedlichen Bodenschichten der Saugkerzengefäße.....	79
Tabelle 33: Maximal zulässige, jährliche Düngemengen für verschiedene Wirtschaftsdünger und Klärschlamm, berechnet anhand von Nährstoffgehalten aus Literaturquellen, für eine Düngung von 170 kg N/ha·Jahr	93
Tabelle 34: Antibiotikafrachten, die sich aus den zulässigen jährlichen Düngemengen von Wirtschaftsdüngern und Klärschlamm (Tab. 33) ergeben (es wurden die maximalen in dieser Arbeit bestimmten Antibiotikagehalte in Probenmaterialien zugrunde gelegt, Trockenmassen entsprechen denen der Proben)	94

Abkürzungen

AbfKlärV	Klärschlammverordnung
Al	Aluminium
CAL	Calcium-Ammonium-Lactat
Ca	Calcium
CP	Ciprofloxacin
CTC	Chlortetracyclin
DCP	Dicalciumphosphat
dest.	destilliert
DF	Difloxacin
DMC	Demeclocyclin
DüMV	Düngemittelverordnung
DüngG	Düngegesetz
DüV	Düngeverordnung
EC _x	Effect-Concentration (Effektkonzentration)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Enhanced-Mass Spectrometry
EN	Enrofloxacin
Fe	Eisen
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
ICP-MS	inductively coupled plasma mass spectrometry
ICP-OES	inductively coupled plasma optical emission spectrometry
K	Kalium
LC/MS	Liquid Chromatography Mass-Spectroscopy
LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
LOQ	Limit of Quantification (Bestimmungsgrenze)
MCP	Monocalciumphosphat
Mg	Magnesium
Mn	Mangan
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Mass Spectrometry
MTC	Methacyclin
N	Stickstoff
Na	Natrium
NAC	Neutral-Ammoniumcitrat

NawaRo	Nachwachsende Rohstoffe
NF	Norfloxacin
NO ₃	Nitrat
OF	Ofloxacin
OTC	Oxytetracyclin
P	Phosphor
S:N	Signal to Noise (Signal-Rausch Verhältnis)
SD	Sulfadiazin
SM	Sulfamethazin
SMZ	Sulfamethoxazol
SPE	Solid Phase Extratction (Festphasenextraktion)
TC	Tetracyclin
TCP	Tricalciumphosphat
UV	Ultraviolett

