

Eliminierung von Tierarzneimitteln durch effektive Güllebehandlung

AZ: 31812/01-31

Abschlussbericht

Erstellt von

Dr. habil. Astrid Spielmeyer, Justus-Liebig-Universität Gießen

Dr. Liina Nurk, Dr. Fabian Jacobi, Landesbetrieb Hessisches Landeslabor
(Standort Bad Hersfeld)

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az	31812/01	Referat	31	Fördersumme	343.795 €
Antragstitel	Förderinitiative Nachhaltige Pharmazie 2: Eliminierung von Tierarzneimitteln durch effektive Güllebehandlung				
Stichworte	Landwirtschaft, Umweltchemikalien Biogas, FI – Nachhaltige Pharmazie, Düngung				
Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)		
42 Monate	01.04.2015	30.09.2018			
Zwischenberichte	31.03.2016	31.03.2017			
Bewilligungsempfänger	Justus-Liebig-Universität Gießen Fachbereich Biologie und Chemie Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie Heinrich-Buff-Ring 17 35392 Gießen			Tel	0641-9934953
				Fax	0641-9934909
				Projektleitung	Dr. habil. Astrid Spielmeyer
				Bearbeiter	
Kooperationspartner	Landesbetrieb Hessisches Landeslabor Fachgebiet IV.5 Erneuerbare Energien, Boden und Sekundärrohstoffe Schlossstraße 26 36251 Bad Hersfeld				

Zielsetzung und Anlass des Vorhabens

Antibiotika werden in beträchtlicher Menge in der Veterinärmedizin eingesetzt (733 t im Jahr 2017). Ein Großteil der Verbindungen wird vom Tier über Gülle und Faeces wieder ausgeschieden. Durch die Verwendung von Gülle als Wirtschaftsdünger gelangen diese Substanzen im Tonnenmaßstab in die Umwelt. Mögliche Folgen, wie die Ausbildung von Resistenzen oder die Auswaschung der Substanzen ins Grundwasser, sind bislang nicht vollständig erforscht. Gülle wird auch als Substrat in Biogasanlagen eingesetzt. Über das Verhalten von Antibiotika im anaeroben Fermentationsprozess liegen bisher nur vereinzelte Informationen vor. Im Rahmen des Projektes sollte das Eliminierungsverhalten von Antibiotika im Prozess der Biogasanlage untersucht werden. Ziel war eine Prozessoptimierung hinsichtlich einer hohen Antibiotikaeliminierung ohne Beeinträchtigung der Biogasausbeute.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Anhand von semi-kontinuierlichen Fermenterstudien wurde im Labormaßstab eine Biogasanlage simuliert (Studien durchgeführt am LHL-Standort in Bad Hersfeld). Durch den Zusatz von mit Antibiotika dotierter Gülle wurde untersucht, in welchem Umfang der anaerobe Prozess eine Antibiotikaeliminierung bewirken kann. Darüber hinaus wurden Parameter des Fermentationsprozesses variiert (vorgeschaltete saure Hydrolyse, Zusatz von Enzymen, Temperatur). Bislang wurden derartige Prozessvariationen nur im Hinblick auf die Biogasausbeute vorgenommen. Hier sollte als weiterer Aspekt die Antibiotikaeliminierung mit eingebunden werden. Anhand von *in vitro* Experimenten wurden die für die Eliminierung entscheidenden Faktoren (pH-Wert, Temperatur, Sorption u.a.) ermittelt. In dem Zusammenhang wurden für die Tetracycline Eliminierungsprodukte identifiziert und hinsichtlich ihrer antibiotischen Aktivität untersucht. Für die Sulfonamide wurden durch den Einsatz von Standardsubstanzen die relevanten Strukturelemente für die Eliminierung erforscht und ein möglicher Mechanismus abgeleitet. Mittels Sorptionsstudien wurde die Reversibilität dieser Eliminierung untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

In vitro Studien mit 24-stündiger Inkubation in Reinstwasser haben gezeigt, dass Tetracyclin und Chlortetracyclin eine deutliche Temperaturabhängigkeit mit sinkender Stabilität bei steigender Temperatur aufweisen. Hinzu kam eine höhere Eliminierung mit steigendem pH-Wert, die im Fall des Chlortetracyclins überwiegend auf die abiotische Bildung von iso-Chlortetracyclin zurückgeht. Iso-Chlortetracyclin und die Sulfonamide Sulfadiazin und Sulfamethazin unterlagen im Bereich von 35 bis 60 °C sowie im pH-Bereich von 4,5 bis 8,5 keiner Eliminierung. Auch nach zehn Tagen trat bei den Sulfonamiden keine Abnahme der Konzentration auf, während iso-Chlortetracyclin in diesem Zeitraum einen Rückgang von bis zu 64% aufwies. Sulfonamide zeigten damit eine hohe chemische Stabilität unter den getesteten Bedingungen.

In den semi-kontinuierlichen Fermenterstudien wurden verschiedene Prozessparameter hinsichtlich ihres Einflusses auf die Biogasproduktion und die Antibiotikaeliminierung untersucht. Ein positiver Einfluss auf die Methanausbeute wurde nur unter thermophilen Bedingungen in Kombination mit einer vorgeschalteten sauren Hydrolyse ermittelt. Die anderen getesteten Varianten unterschieden sich nicht voneinander. Bei den Versuchen mit Enzymzusatz wurde eine verringerte Viskosität des Fermenter-inhalts festgestellt. Dies könnte zu einer Einsparung von Energiekosten für den Anlagenbetreiber führen. Hinsichtlich der Antibiotikaeliminierung zeigten sich einige Unterschiede zu den *in vitro* Studien in Reinstwasser. Sulfonamide erreichten Eliminierungsraten zwischen 26 und 63%. Aufgrund der festgestellten chemischen Stabilität wurde hier eine Eliminierung durch Sorptionsprozesse vermutet. Dafür sprach auch der Einfluss der zugesetzten Menge und der Beschaffenheit der Maissilage. Der Zusatz von Hydrolysat führte unter mesophilen Bedingungen zu niedrigeren Eliminierungsraten. Die Tetracycline zeigten in der Fermentermatrix eine größere Stabilität als in den feststofffreien wässrigen Lösungen. Der Einfluss der Temperatur fiel weniger deutlich aus als in den *in vitro* Studien. Auch hier konnte ein Einfluss der Beschaffenheit der Maissilage festgestellt werden mit niedrigeren Eliminierungsraten bei Hydrolysatzusatz. Dies weist ebenfalls auf die Bedeutung von Sorptionsprozessen für die Eliminierung von Tetracyclinen im Rahmen der anaeroben Fermentation hin. Keine der untersuchten Fermentationsbedingungen führte zu einer vollständigen Eliminierung der Antibiotika.

Aufgrund der Eliminierung der Tetracycline in wässriger Lösung wurde die Bildung von Transformationsprodukten untersucht. Für Tetracyclin konnte ein Transformationsprodukt (*seco*-Cyclin A) identifiziert werden. Die Bildung der Verbindung wurde durch Phosphat gefördert und durch die Anwesenheit zweiwertiger Kationen gehemmt. Das Produkt konnte ebenfalls in Fermenterproben nachgewiesen werden, die Transformation findet somit auch in komplexen Matrices statt. Allerdings lagen die detektierten Gehalte im einstelligen $\mu\text{g kg}^{-1}$ Bereich (<1% des Tetracyclin-Gehaltes). Stabilitätsuntersuchungen in Güllematrix konnten zeigen, dass das Transformationsprodukt selbst einer Eliminierung unterliegt. Der genaue Beitrag dieser Verbindung zur Eliminierung von Tetracyclin kann deswegen nicht abgeschätzt werden. Für Chlortetracyclin konnten zwei dem *seco*-Cyclin A ähnliche Verbindungen neu identifiziert werden. Aufgrund der strukturellen Veränderungen im Molekül kam es zu einer deutlichen Abnahme der antibiotischen Aktivität der Transformationsprodukte. Für Konzentrationen bis 500 mg L^{-1} konnte keine Hemmung des Testkeims festgestellt werden.

Sowohl Sulfonamide als auch Tetracycline zeigten in Pufferlösung bei Zusatz von Maissilage im Laufe der Inkubation eine Eliminierung, die bei den Sulfonamiden stärker ausgeprägt war als bei den Tetracyclinen. Da in wässriger, feststofffreier Lösung keine Eliminierung der Sulfonamide festgestellt worden war, wurden Sorptionsprozesse als Ursache angesehen. Anhand von Sorptionsstudien in Fermentermatrix wurde ein Zusammenhang zwischen der Eliminierungsrate und der zugesetzten Menge der Maissilage festgestellt. Eine vorherige Behandlung der Maissilage durch Säure führte zu einer Abnahme der Eliminierungsrate. Dies entspricht den Beobachtungen in den semi-kontinuierlichen Fermenterstudien. Durch die Inkubation mit verschiedenen Standardsubstanzen in Reinstwasser konnten Lignin und Huminsäuren als relevante Verbindungen für die Eliminierung identifiziert werden. Studien mit der Modellverbindung 2,6-Dimethoxyphenol in Gegenwart von Kieselgel als Trägermatrix wiesen auf die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Sulfonamiden und dem Phenol hin. Dies spricht für eine Eliminierung der Verbindungen durch eine Chemisorption. Die Eliminierung von Tetracyclinen erfolgte unabhängig von der Modellverbindung, so dass für diese Substanzen andere

Eliminierungsprozesse relevant sein müssen. In der Literatur werden hierzu Prozesse wie zum Beispiel die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen genannt.

Sorptionsprozesse können prinzipiell reversibel sein. Um zu überprüfen, inwiefern die Sorptionsprozesse in der Güllematrix umkehrbar sind, wurde mit Antibiotika dotierte Gülle mit Maissilage inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde die Flüssigphase mit antibiotikafreier Gülle ausgetauscht. Vor allem bei den Tetracyclinen konnte ein Übergang der Verbindungen aus der Festphase in die Flüssigphase beobachtet werden. Für Sulfonamide deuten die Ergebnisse auf einen ähnlichen Zusammenhang hin. Die in den Fermenterstudien beobachtete Eliminierung der Verbindungen durch Sorption muss vor diesem Hintergrund kritisch betrachtet werden, da die Substanzen potentiell wieder freigesetzt werden können.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Die Ergebnisse dieses Projekts wurden wie folgt präsentiert

- Poster auf dem Deutschen Lebensmittelchemiker Tag, September 2015 (Karlsruhe, D)
- Vortrag auf der EuroResidue Conference, Mai 2016 (Egmond aan Zee, NL)
- Poster auf dem Deutschen Lebensmittelchemiker Tag, September 2016 (Freising, D)
- Vortrag beim Infotag „Tierarzneimittelrückstände in Lebensmitteln“, Oktober 2017 (Gießen, D)
- Poster auf der Green Pharmacy Conference 2017 (Utrecht, NL)

Eine Publikation, die sich mit dem Vorkommen und dem Verbleib von Antibiotika in Gülle beschäftigt, ist im Journal Sustainable Chemistry and Pharmacy erschienen („Occurrence and fate of antibiotics in manure during manure treatments: A short review“ <https://doi.org/10.1016/j.scp.2018.06.004>).

Weitere Publikationen sind für die Ergebnisse der Fermenterstudien, der Strukturaufklärung der Transformationsprodukte sowie der Sorptions-/Desorptionsversuche vorgesehen.

Fazit

Anhand verschiedener Studien konnte Sorption als zentraler Eliminierungsweg für Sulfonamide und Tetracycline in Gülle- und Fermentermatrix identifiziert werden. Im Vergleich zu rein wässrigen Lösungen, üben Bestandteile der Güllematrix einen stabilisierenden Effekt auf die Substanzen aus. Dadurch war es in den entsprechenden Versuchen nicht möglich durch den Zusatz eines Sorptionsmaterials die Antibiotika aus der Gülle vollständig zu entfernen. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Sorptionsprozesse (teilweise) reversibel sind. Aus diesem Grund ist langfristig mit einer erneuten Freisetzung der Verbindungen aus der Matrix zu rechnen, was Untersuchungen von Grundwasserproben unter landwirtschaftlichen Nutzflächen bereits heute zeigen. Konkrete Handlungsempfehlungen zur Verminderung der Antibiotikabelastung von Wirtschaftsdüngern können nicht gegeben werden. Das Ziel muss es deswegen sein, die Anwesenheit von Antibiotika in der Gülle durch einen reduzierten Einsatz in der Veterinärmedizin zu minimieren.

Zusammenfassung

Anhand verschiedener Studien wurde der Verbleib von Antibiotika im anaeroben Fermentationsprozess untersucht. Ziel war es, die relevanten Eliminierungswege zu identifizieren und eine mögliche Optimierung des Prozesses hinsichtlich der Entfernung der Antibiotika aus der Gülle zu erzielen.

In vitro Studien mit 24-stündiger Inkubation in Reinstwasser haben gezeigt, dass Tetracyclin und Chlortetracyclin eine deutliche Temperaturabhängigkeit mit sinkender Stabilität bei steigender Temperatur aufweisen. Hinzu kam eine höhere Eliminierung mit steigendem pH-Wert, die im Fall des Chlortetracyclins überwiegend auf die abiotische Bildung von iso-Chlortetracyclin zurückgeht. Iso-Chlortetracyclin und die Sulfonamide Sulfadiazin und Sulfamethazin unterlagen im Bereich von 35 bis 60 °C sowie im pH-Bereich von 4,5 bis 8,5 keiner Eliminierung. Auch nach zehn Tagen trat bei den Sulfonamiden keine Abnahme der Konzentration auf, während iso-Chlortetracyclin in diesem Zeitraum einen Rückgang von bis zu 64% aufwies. Sulfonamide zeigten damit eine hohe chemische Stabilität unter den getesteten Bedingungen.

In den semi-kontinuierlichen Fermenterstudien wurden verschiedene Prozessparameter hinsichtlich ihres Einflusses auf die Biogasproduktion und die Antibiotikaeliminierung untersucht. Ein positiver Einfluss auf die Methanausbeute wurde nur unter thermophilen Bedingungen in Kombination mit einer vorgeschalteten sauren Hydrolyse ermittelt. Die anderen getesteten Varianten unterschieden sich nicht voneinander. Bei den Versuchen mit Enzymzusatz wurde eine verringerte Viskosität des Fermenterinhalt festgestellt. Dies könnte zu einer Einsparung von Energiekosten für den Anlagenbetreiber führen. Hinsichtlich der Antibiotikaeliminierung zeigten sich einige Unterschiede zu den *in vitro* Studien in Reinstwasser. Sulfonamide erreichten Eliminierungsraten zwischen 26 und 63%. Aufgrund der festgestellten chemischen Stabilität wurde hier eine Eliminierung durch Sorptionsprozesse vermutet. Dafür sprach auch der Einfluss der zugesetzten Menge und der Beschaffenheit der Maissilage. Der Zusatz von Hydrolysat führte unter mesophilen Bedingungen zu niedrigeren Eliminierungsraten. Die Tetracycline zeigten in der Fermentermatrix eine größere Stabilität als in den feststofffreien wässrigen Lösungen. Der Einfluss der Temperatur fiel weniger deutlich aus als in den *in vitro* Studien. Auch hier konnte ein Einfluss der Beschaffenheit der Maissilage festgestellt werden mit niedrigeren Eliminierungsraten bei Hydrolysatzusatz. Dies weist ebenfalls auf die Bedeutung von Sorptionsprozessen für die Eliminierung von Tetracyclinen im Rahmen der anaeroben Fermentation hin. Keine der untersuchten Fermentationsbedingungen führte zu einer vollständigen Eliminierung der Antibiotika.

Aufgrund der Eliminierung der Tetracycline in wässriger Lösung wurde die Bildung von Transformationsprodukten untersucht. Für Tetracyclin konnte ein Transformationsprodukt (*seco*-Cyclin A) identifiziert werden. Die Bildung der Verbindung wurde durch Phosphat gefördert und durch die Anwesenheit zweiwertiger Kationen gehemmt. Das Produkt konnte ebenfalls in Fermenterproben nachgewiesen werden, die Transformation findet demnach auch in komplexen Matrices statt. Allerdings lagen die detektierten Gehalte im einstelligen $\mu\text{g kg}^{-1}$

Bereich (<1% des Tetracyclin-Gehaltes). Stabilitätsuntersuchungen in Güllematrix konnten zeigen, dass das Transformationsprodukt selbst einer Eliminierung unterliegt. Der genaue Beitrag dieser Verbindung zur Eliminierung von Tetracyclin kann deswegen nicht abgeschätzt werden. Für Chlortetracyclin konnten zwei dem *seco*-Cyclin A ähnliche Verbindungen neu identifiziert werden. Aufgrund der strukturellen Veränderungen im Molekül kam es zu einer deutlichen Abnahme der antibiotischen Aktivität der Transformationsprodukte. Für Konzentrationen bis 500 mg L⁻¹ konnte keine Hemmung des Testkeims festgestellt werden.

Sowohl Sulfonamide als auch Tetracycline zeigten in Pufferlösung bei Zusatz von Maissilage im Laufe der Inkubation eine Eliminierung, die bei den Sulfonamiden stärker ausgeprägt war als bei den Tetracyclinen. Da in feststofffreier Lösung keine Eliminierung der Sulfonamide festgestellt worden war, wurden Sorptionsprozesse als Ursache angesehen. Anhand von Sorptionsstudien in Fermentermatrix wurde ein Zusammenhang zwischen der Eliminierungsrate und der zugesetzten Menge der Maissilage festgestellt. Eine vorherige Behandlung der Maissilage durch Säure führte zu einer Abnahme der Eliminierungsrate. Dies entspricht den Beobachtungen in den semi-kontinuierlichen Fermenterstudien. Durch die Inkubation mit verschiedenen Standardsubstanzen in Reinstwasser konnten Lignin und Huminsäuren als relevante Verbindungen für die Eliminierung identifiziert werden. Studien mit der Modellverbindung 2,6-Dimethoxyphenol in Gegenwart von Kieselgel als Trägermatrix wiesen auf die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Sulfonamiden und dem Phenol hin. Dies spricht für eine Eliminierung der Verbindungen durch eine Chemisorption. Die Eliminierung von Tetracyclinen erfolgte unabhängig von der Modellverbindung, so dass für diese Substanzen andere Eliminierungsprozesse relevant sein müssen. In der Literatur werden hierzu Prozesse wie zum Beispiel die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen genannt.

Sorptionsprozesse können prinzipiell reversibel sein. Um zu überprüfen, inwiefern die Sorptionsprozesse in der Güllematrix umkehrbar sind, wurde mit Antibiotika dotierte Gülle mit Maissilage inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde die Flüssigphase mit antibiotikafreier Gülle ausgetauscht. Vor allem bei den Tetracyclinen konnte ein Übergang der Verbindungen aus der Festphase in die Flüssigphase beobachtet werden. Für Sulfonamide deuten die Ergebnisse auf einen ähnlichen Zusammenhang hin. Die in den Fermenterstudien beobachtete Eliminierung der Verbindungen durch Sorption muss vor diesem Hintergrund kritisch betrachtet werden, da die Substanzen potentiell wieder freigesetzt werden können. Untersuchungen von Grundwasserproben unter landwirtschaftlichen Nutzflächen zeigen bereits heute, dass Sorptionsprozesse im Boden reversibel sind. Sorptionsstudien in wässriger Lösung und Güllematrix weisen außerdem darauf hin, dass Bestandteile der Güllematrix einen stabilisierenden Effekt auf die Substanzen ausüben. Dadurch war es nicht möglich durch den Zusatz eines Sorptionsmaterials die Antibiotika aus der Gülle vollständig zu entfernen. Konkrete Handlungsempfehlungen zur Verminderung der Antibiotikabelastung von Wirtschaftsdüngern können daher nicht gegeben werden. Das Ziel muss es deswegen sein, die Anwesenheit von Antibiotika in der Gülle durch einen reduzierten Einsatz in der Veterinärmedizin zu minimieren.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Motivation	1
1.2 Biogasanlagen in Deutschland.....	2
1.3 Durchgeführte Studien.....	3
2 Stabilitätsuntersuchungen	6
2.1 Durchführung.....	6
2.2 Ergebnisse.....	6
3 Semi-kontinuierliche Fermenterstudien.....	9
3.1 Versuchsaufbau	9
3.2 Biogas- und Methanausbeute.....	10
3.3 Eliminierung der Antibiotika.....	12
3.3.1 Sulfonamide	12
3.3.2 Tetracycline	16
3.4 Zusammenfassung	17
4 Transformationsprodukte	19
4.1 Eliminierung von Tetracyclin	19
4.1.1 Verhalten in Salzlösungen.....	19
4.1.2 Strukturaufklärung	23
4.2 Eliminierung von Chlortetracyclin	25
4.3 Nachweis in Fermenterproben.....	29
5 Sorptionsstudien.....	31
5.1 Sorption in wässriger Lösung	31
5.2 Sorption von Sulfonamiden	32
5.2.1 Sorption in Gülle und Fermentermatrix	32
5.2.2 Einfluss von Zeit und Temperatur.....	36
5.2.3 Einfluss einer Behandlung der Maissilage	38
5.2.4 Relevante Strukturen für die Sorption.....	40
5.2.5 Einfluss von 2,6-Dimethoxyphenol.....	45

5.3	Sorption als Güllebehandlungsmethode	49
5.4	Reversibilität der Sorption.....	52
6	Literaturverzeichnis	55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verwendete Rohstoffe in Biogasanlagen mit A) der allgemeinen Substratzusammensetzung der Anlagen im Bundesgebiet sowie dem massebezogenen Einsatz von B) Exkrementen und C) Nachwachsenden Rohstoffen (Stand Mai 2015, Daten entnommen aus [10]).....	2
Abbildung 2: Strukturen der im Projekt eingesetzten bzw. analysierten Sulfonamide und Tetracycline.....	4
Abbildung 3: Wiederfindungsrate in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert für (A) Chlortetracyclin, (B) Tetracyclin, (C) iso-Chlortetracyclin, (D) Sulfadiazin und (E) Sulfamethazin; die Inkubation erfolgte jeweils für 24 Stunden mit einer Konzentration von 10 µM; Daten entsprechen dem Ergebnis einer Einfachbestimmung	7
Abbildung 4: Berechnete (○,△) und gemessene (●,▲) Gehalte von (A,B) Sulfadiazin, (C,D) Sulfamethazin, (E,F) Tetracyclin, (G,H) Chlortetracyclin und (I,J) Summe von (iso-)Chlortetracyclin in Fermentern unter mesophilen (○,●) und thermophilen (△,▲) Bedingungen; linke Spalte zeigt Zusatz von Maissilage (Versuche 1 und 3), rechte Spalte zeigt Zusatz von Hydrolysat (Versuche 2 und 4); Gehalte beziehen sich auf mg pro kg Feuchtgewicht; die gepunktete Linie dient der Orientierung; aufgrund unterschiedlicher Fütterungsraten unterscheiden sich die theoretischen Werte der linken und rechten Spalte um 4,7% (siehe Tabelle 2).....	15
Abbildung 5: Inkubation von Tetracyclin in (A,B) 100 mM Phosphatpuffer sowie (C,D) 1 mM Phosphatpuffer mit (A,C) pH 6,5 und (B,D) pH 8,0; Inkubation erfolgte bei 40 °C (blau), 50 °C (grau) sowie 60 °C (schwarz); Balken gleicher Farbe zeigen von links nach rechts das Messergebnis nach 24, 48 und 72 Stunden; Ergebnisse entsprechen einer Einfachbestimmung.....	19
Abbildung 6: Verfärbung der Tetracyclin-Proben in 1 mM Phosphatpuffer bei 60 °C nach dreitägiger Inkubation	20
Abbildung 7: HPLC-UV-Chromatogramm einer Standardlösung von Anhydro-Tetracyclin (grün) und Tetracyclin (schwarz) sowie einer Tetracyclin-Probe nach 24-stündiger Inkubation in 1 mM Phosphatpuffer (pH 8,0, 60 °C) (blau); TP - Transformationsprodukt	21
Abbildung 8: Potentielle Bindungsstellen zur Komplexbildung von Tetracyclin mit zweiwertigen Metallionen (M ²⁺).....	22
Abbildung 9: UV/VIS-Spektren von Tetracyclin (durchgezogene Linie) und dem Transformationsprodukt (gepunktete Linie); Angabe der für die Absorptionsmaxima verantwortlichen Chromophore nach [53]	23
Abbildung 10: Struktur von Tetracyclin (links) und Transformationsprodukt 1 (<i>seco</i> -Cyclin A) (rechts)	24
Abbildung 11: Hemmstofftest von Tetracyclin und dessen Transformationsprodukt (TP1) <i>seco</i> -Cyclin A.....	25

Abbildung 12: HPLC-UV-Chromatogramme der Langzeitinkubation von Chlortetracyclin bei 40 °C in Phosphatpuffer (5 mM, pH 8,0); Detektion erfolgte bei 277 nm; CTC - Chlortetracyclin, (epi-)isoCTC - (4-epi-)iso-Chlortetracyclin, TP - Transformationsprodukt 26

Abbildung 13: Strukturen von iso-Chlortetracyclin und seinem 4-Epimer sowie der neu identifizierten Transformationsprodukte 2 und 3 27

Abbildung 14: Hemmstofftest von Chlortetracyclin (CTC), iso-Chlortetracyclin (isoCTC) und den neu identifizierten Transformationsprodukten (TP 2 und 3)..... 28

Abbildung 15: Wiederfindungsraten von Sulfadiazin (○), Sulfamethazin (●), Tetracyclin (△), Chlortetracyclin (□) und der Summe von (iso-)Chlortetracyclin (■) nach Inkubation in Hydrogencarbonatpuffer (A) ohne und (B) mit Zusatz von Maissilage; Daten sind das Ergebnis einer Einfachbestimmung 31

Abbildung 16: Strukturformeln von (A) *p*-Cumarsäure, (B) Ferulasäure, (C) Sinapinsäure, (D) Zimtsäure sowie (E) Zimtalkohol 43

Abbildung 17: Strukturen von (A) Syringasäure und (B) dem von Bialk *et al.* [85] identifizierten Addukt mit Sulfamethazin, (C) 2,6-Dimethoxyphenol und (D) dem in dieser Studie detektierten Sulfamethazin-Addukt 47

Abbildung 18: Inkubation von 2,6-Dimethoxyphenol mit Kieselgel; gezeigt sind die Proben (I) nach dem Zentrifugieren und (II) kurze Zeit nach dem Aufschlännen mit (A) 0,2 mg kg⁻¹ und (B) 2,0 mg kg⁻¹ Ausgangskonzentration des Phenols; Probennahmezeitpunkte (v.l.n.r.) 4 d, 11 d, 18 d, 25 d, 32 d, 39 d..... 48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Parameter der in den Studien verwendeten Substrate 5

Tabelle 2: Design und Fütterungsraten der semi-kontinuierlichen Fermenterstudien 9

Tabelle 3: Kumulative Biogas- und Methanausbeute im Rahmen der semi-kontinuierlichen Fermenterstudien 11

Tabelle 4: Eliminierungsraten der untersuchten Antibiotika in Abhängigkeit von dem Versuchsaufbau 13

Tabelle 5: Wiederfindungsraten von Tetracyclin nach 24-stündiger Inkubation in Salzlösungen..... 21

Tabelle 6: Magnesium- und Calciumgehalte in Wirtschaftsdüngern..... 23

Tabelle 7: Bildung der Transformationsprodukte in Rindergülle 29

Tabelle 8: Eliminierungsraten der Sulfonamide in Abhängigkeit des Feststoffanteils und der Feststoffart in Fermentermatrix bei verschiedenen Temperaturen..... 33

Tabelle 9: Statistischer Vergleich der Eliminierungsraten der Sulfonamide bei verschiedenen Feststoffanteilen in Abhängigkeit von der Art des Feststoffes, der Inkubationstemperatur und der Matrix 35

Tabelle 10: Eliminierungsraten der Sulfonamide in den Matrices Fermenter und Rindergülle in Abhängigkeit von der Inkubationszeit 36

Tabelle 11: Eliminierungsraten der Sulfonamide in der Fermentermatrix in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur..... 37

Tabelle 12: Eliminierungsraten der Sulfonamide in Abhängigkeit von der Behandlung der Maissilage..... 39

Tabelle 13: Eliminierungsraten der Sulfonamide in Abhängigkeit von der Anwesenheit verschiedener Strukturelemente in Lösungen bzw. Suspensionen..... 41

Tabelle 14: Eliminierungsraten der Sulfonamide in Huminsäuren-Lösungen bzw. - Suspensionen unterschiedlicher Konzentrationen..... 42

Tabelle 15: Eliminierungsraten der Sulfonamide nach Inkubation mit Säuremonomeren 44

Tabelle 16: Eliminierungsraten der Sulfonamide in Abhängigkeit von Dimethoxyphenolen und Kieselgel..... 45

Tabelle 17: Eliminierungsraten der Sulfonamide und Tetracycline bei Inkubation mit Kieselgel in An- und Abwesenheit von 2,6-Dimethoxyphenol 46

Tabelle 18: Eliminierungsraten der Sulfonamide in Abhängigkeit von der Inkubationszeit des 2,6-Dimethoxyphenols 49

Tabelle 19: Eliminierungsraten der Antibiotika in Wasser und Gülle mit Zusatz von Erde.... 50

Tabelle 20: Eliminierungsraten der Antibiotika nach siebentägiger Inkubation in verschiedenen Güllematrices und Gärresten 51

Tabelle 21: Desorption der Antibiotika in Güllematrix 53

1 Einleitung

1.1 Motivation

Antibiotika werden weltweit in der Veterinärmedizin eingesetzt. Schätzungen gehen bis 2030 von einem Anstieg auf rund 106.000 t aus, wobei der Großteil voraussichtlich in China appliziert werden wird [1]. Seit 2011 werden in Deutschland Daten über die an Tierärzte abgegebenen Antibiotika erhoben und vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) veröffentlicht. Die Abgabemenge lag im Jahr 2017 bei 733 t, rund ein Drittel geht auf Tetracycline (188 t) und Sulfonamide (62 t) zurück [2].

Aufgrund der unvollständigen Resorption und/oder Metabolisierung der Verbindungen durch das behandelte Tier können Antibiotika weltweit in Gülleproben und, bei Verwendung kontaminierter Gülle in Biogasanlagen, Fermenterrückständen nachgewiesen werden (siehe Übersicht in [3,4]). Gülle und Gärreste werden in der Regel auf landwirtschaftlichen Nutzflächen zur Bodendüngung ausgebracht (Deutschland: 204 Mio. m³ in 2015, [5]), so dass Antibiotika auf diesem Weg in die Umwelt gelangen können. Lysimeterstudien haben gezeigt, dass über Gülle in den Boden eingebrachte Sulfonamide in wasserführende Schichten verlagert werden können. Die im Sickerwasser gemessenen Konzentrationen weisen darauf hin, dass der Großteil der Substanzen zunächst im Boden verbleibt, diese aber über Jahrzehnte hinweg ausgewaschen werden können [6]. Potentielle Auswirkungen auf Bodenorganismen im Hinblick auf eine mögliche Förderung der Resistenzbildung sind derzeit nicht abschätzbar. Vor diesem Hintergrund sollte eine möglichst umfangreiche Eliminierung der Antibiotika in der Güllematrix vor der Ausbringung auf den landwirtschaftlichen Nutzflächen erfolgen.

Die Eliminierung von Antibiotika in verschiedenen Güllebehandlungsverfahren (Lagerung, Kompostierung, Fermentation) wurde in der Literatur für mehrere Studien beschrieben. Dabei traten für die gleiche Verbindung bei ähnlichen Versuchsansätzen zum Teil gegensätzliche Ergebnisse auf (siehe Übersicht in [3]). Die für die Eliminierung relevanten Prozesse blieben oft unbekannt bzw. wurden nur in wenigen Studien untersucht. Aus diesem Grund war bislang keine abschließende Bewertung des anaeroben Fermentationsprozesses hinsichtlich seines Potentials der Antibiotikaeliminierung möglich.

In vielen Studien wird der Begriff „Abbau“ im Zusammenhang mit einer beobachteten Abnahme der Analytkonzentration verwendet. Dies suggeriert eine umfassende Änderung der Ausgangsstruktur bis hin zu einer Mineralisierung. Dabei muss ein Rückgang der Konzentration nicht durch eine Transformation der Verbindung verursacht werden. Verschiedene Prozesse (Sorption, Bildung von Einschlussverbindungen, Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände [7,8]) können zu einer (scheinbaren) Abnahme der Analytkonzentration führen. Derartige Prozesse können reversibel sein, so dass es zu einer erneuten Freisetzung der Verbindungen kommen kann. Vor diesem Hintergrund sollte der Begriff

„Eliminierung“ verwendet werden, solange die relevanten Eliminierungswege nicht bekannt sind oder nachgewiesen wurden.

1.2 Biogasanlagen in Deutschland

Gemäß dem Fachverband Biogas e.V. existierten im Jahr 2017 deutschlandweit 9.331 Biogasanlagen. Laut Prognose des Verbandes soll im Jahr 2018 ein Zuwachs um 163 Anlagen erfolgen [9]. Die Technologie wird deutschlandweit eingesetzt und ist vor allem in den Gebieten mit intensiver Landwirtschaft weit verbreitet [10]. Gleichzeitig sind dies die Regionen mit hohen Antibiotikaabgaben an die Tierärzte (vgl. Daten des BVL, [2]).

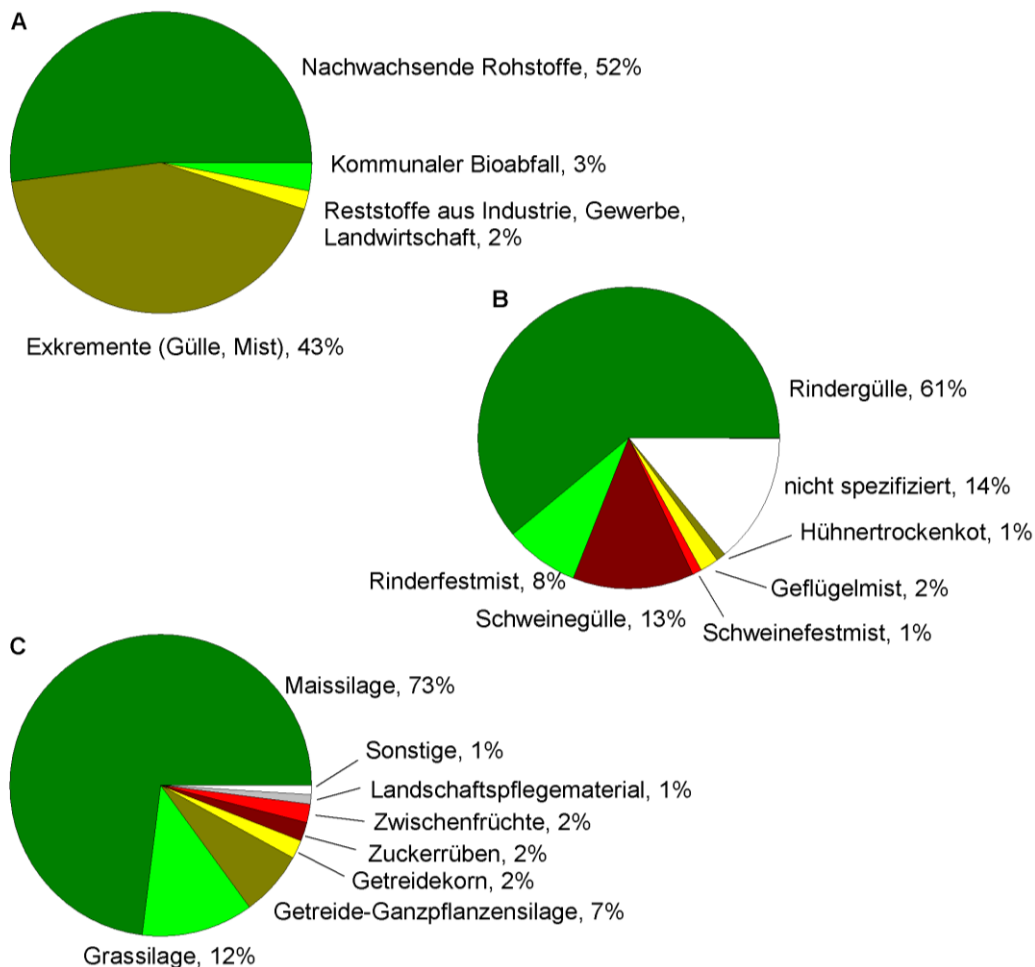


Abbildung 1: Verwendete Rohstoffe in Biogasanlagen mit A) der allgemeinen Substratzusammensetzung der Anlagen im Bundesgebiet sowie dem massebezogenen Einsatz von B) Exkrementen und C) Nachwachsenden Rohstoffen (Stand Mai 2015, Daten entnommen aus [10])

Das Deutsche Biomasseforschungszentrum (DBFZ) hat eine Aufstellung der Zusammensetzung der in Biogasanlagen verwendeten Substrate vorgenommen. Die

nachfolgenden Daten wurden durch das DBFZ mittels Fragebogen erhoben. Laut den Autoren wurden alle Bioenergieanlagen angeschrieben, die gemäß des Erneuerbaren Energie Gesetzes einspeisen. Dabei wurden 10443 Fragebögen verschickt, der Rücklauf lag bei 1552 Bögen (14,9%) [10]. Im Hinblick auf die verwendeten Substrate kann somit von einem repräsentativen Bild ausgegangen werden (Stand Mai 2015).

Gemäß der Umfrageergebnisse werden in dem Fermentationsprozess vor allem Exkremente und nachwachsende Rohstoffe (NaWaRo) eingesetzt. Bioabfälle und Reststoffe z. B. aus der Industrie spielen insgesamt nur eine untergeordnete Rolle (Abbildung 1 A). Es existieren jedoch Anlagen, die sich unter anderem auf die Vergärung von Lebensmittelabfällen spezialisiert haben [10]. Bei den Exkrementen macht, bezogen auf die Masse, Rindergülle den größten Anteil aus, gefolgt von Schweinegülle und Rinderfestmist (Abbildung 1 B) [10]. Eine Ursache hierfür ist die weite Verbreitung von Rinder- und Milchviehhaltung im Vergleich zu Schweinezuchtbetrieben [11]. Im Fall der NaWaRo ist der Einsatz von Maissilage am bedeutsamsten, Gras oder Getreide-Ganzpflanzensilagen (GPS) werden nur in ca. 20% der Fälle verwendet (Abbildung 1 C) [10].

Das bei der anaeroben Fermentation von Biomasse gebildete Gas besteht überwiegend aus Kohlendioxid und Methan. Der Prozess der Gasbildung läuft in vier Stufen ab, der Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese [12]. An jedem Schritt sind unterschiedliche Mikroorganismen beteiligt, die sich hinsichtlich ihrer Anforderung an den pH-Wert und der Toleranz gegenüber Sauerstoff unterscheiden [12,13]. Bei sogenannten zweistufigen Prozessen finden die Hydrolyse und Acidogenese in einem separaten Reaktor statt (saure Hydrolyse-Einheit). Dies kann gerade bei wechselnden oder schnell hydrolysierbaren Substraten zu einem stabileren Prozess führen, da ein homogeneres Substrat in den Hauptfermenter gelangt oder eine Übersäuerung durch die schnelle Bildung von organischen Säuren vermieden wird. Der überwiegende Teil der Biogasanlagen in Deutschland wird als einstufiger Reaktor betrieben [14,15].

1.3 Durchgeführte Studien

Im Rahmen des Projektes sollte die anaerobe Fermentation von Gülle hinsichtlich ihres Potentials der Antibiotikaeliminierung untersucht werden. Der Fokus wurde dabei auf die Sulfonamide und Tetracycline gelegt. Diese Substanzklassen zählen weltweit zu den am häufigsten eingesetzten Antibiotika und können, im Gegensatz zu den leicht hydrolysierbaren β -Lactamen, in Gülle und Fermenterrückständen nachgewiesen werden (siehe Übersicht in [3,4]).

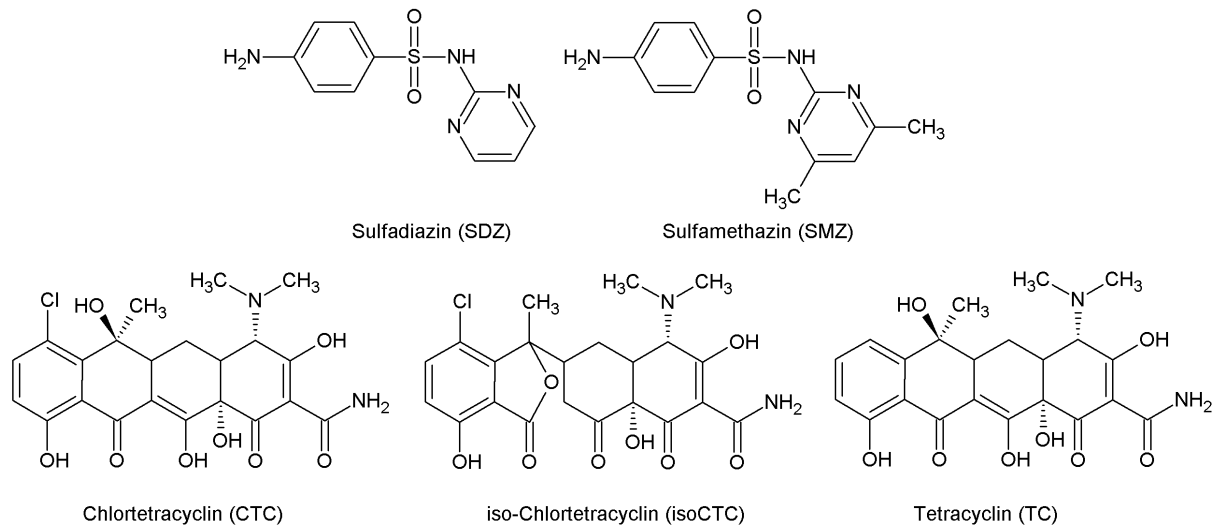


Abbildung 2: Strukturen der im Projekt eingesetzten bzw. analysierten Sulfonamide und Tetracycline

Die Untersuchungen wurden anhand von jeweils zwei Vertretern der Sulfonamide (Sulfadiazin (SDZ), Sulfamethazin bzw. Sulfadimidin (SMZ)) und Tetracycline (Chlortetracyclin (CTC), Tetracyclin (TC)) durchgeführt, da diese global in der Veterinärmedizin zum Einsatz kommen (Abbildung 2). Im Jahr 2015 trugen diese vier Verbindungen mit rund 171 t 21,2% zu der Gesamtabgabemenge der Veterinärantibiotika in Deutschland bei (805 t, [16]). Iso-Chlortetracyclin (isoCTC) stellt ein abiotisches Transformationsprodukt von Chlortetracyclin dar, das bei pH-Werten oberhalb von 7 gebildet wird (Abbildung 2) [17]. Da Gülle und Gärreste in der Regel schwach alkalische pH-Werte aufweisen [18] und die Bildung von iso-Chlortetracyclin somit zu erwarten war, wurde diese Verbindung ebenfalls in den Probenextrakten analysiert.

Für die Untersuchung des anaeroben Fermentationsprozesses wurden Versuche in semi-kontinuierlich betriebenen Fermentern durchgeführt. Dadurch sollte eine Simulation der Abläufe in Biogasanlagen erreicht werden. Bei den in den Studien eingesetzten Substraten handelte es sich in der Regel um (fermentierte) Rindergülle sowie Maissilage. Diese Zusammensetzung spiegelt die Situation in einem Großteil der in Deutschland betriebenen Biogasanlagen wider (vergleiche Abbildung 1). Hinsichtlich der Parameter pH-Wert und Trockensubstanz waren die Materialien vergleichbar mit Angaben in der Literatur (Tabelle 1) [18]. Für die Inkubation wurde der Fermenterinhalt einer mesophilen oder thermophilen Biogasanlage (Inokulum) verwendet. Die jeweiligen Substrate wurden von der Biogasanlage am LHL-Standort in Bad Hersfeld oder von einer thermophilen Biogasanlage der Region (Inokulum für thermophile Versuchsreihen) bezogen.

Tabelle 1: Parameter der in den Studien verwendeten Substrate

Substrat	pH	TS [%]	oTS [%]	Asche [%]
gesiebte fermentierte Gülle	7,8-8,0	4,7-5,2	3,1-3,7	1,2-1,7
Rindergülle	~8	8-11	6-9	1,5-2,4
Maissilage	5,5-5,9	28-37	27-36	1,0-1,7

oTS - organische Trockensubstanz, TS - Trockensubstanz

Rund ein Viertel der in Deutschland existierenden Biogasanlagen steht in Bayern. Eine Umfrage unter den Anlagenbetreibern hat ergeben, dass ca. 75% der Anlagen im mesophilen Temperaturbereich arbeiten (35-44 °C) [19]. Die Inkubationen der in diesem Projekt durchgeführten Studien erfolgten überwiegend bei mesophilen Bedingungen. Um den Einfluss der Temperatur zu ermitteln, wurden auch thermophile Bedingungen untersucht. Darüber hinaus wurde eine Vorbehandlung des Eingangssubstrats durchgeführt (saure Hydrolyse) und der Zusatz von Enzymen zum Hauptfermenter getestet. In den Studien wurde nicht nur die Eliminierung der zugesetzten Antibiotika analysiert, sondern auch der Methanertrag ermittelt.

Anhand von *in vitro* Studien wurde der Einfluss von Temperatur, pH-Wert und Salzgehalten auf die Stabilität der verwendeten Antibiotika untersucht. Im Fall der Tetracycline wurden neue Transformationsprodukte isoliert und charakterisiert. Außerdem wurden verschiedene Sorptionsstudien durchgeführt, um den Einfluss der zugesetzten Feststoffe auf die Eliminierung zu ermitteln sowie die Reversibilität dieser Prozesse abzuschätzen.

2 Stabilitätsuntersuchungen

2.1 Durchführung

Tetracycline und Sulfonamide weisen unterschiedliche Stabilitäten in Abhängigkeit von der Temperatur und dem pH-Wert auf. Um den Einfluss dieser Parameter auf die Eliminierung abschätzen zu können, wurden die ausgewählten Antibiotika sowie iso-Chlortetracyclin separat in Reinstwasser inkubiert. Dieses wurde mit 1 M Natronlauge oder 1 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 4,5 bis 8,5 eingestellt. Der untersuchte Temperaturbereich lag im Fall der 24-stündigen Inkubation zwischen 35 °C und 60 °C. Die Konzentration der Antibiotika im Versuchsansatz betrug jeweils 10 µM. Da im Fall von Sulfadiazin und Sulfamethazin keine bzw. im Fall von iso-Chlortetracyclin nur eine geringfügige Eliminierung beobachtet wurde, wurden diese Verbindungen zusätzlich für 10 Tage bei 40 °C, 50 °C sowie 60 °C inkubiert. Der pH-Wert der Lösungen wurde auf 4,5, 6,5 sowie 8,0 eingestellt.

2.2 Ergebnisse

Von den fünf untersuchten Verbindungen zeigte hinsichtlich der Stabilität Chlortetracyclin die größte Abhängigkeit von den Parametern Temperatur und pH-Wert (Abbildung 3 A). Mit zunehmendem pH-Wert und/oder zunehmender Temperatur wurde eine praktisch vollständige Eliminierung ermittelt, die vor allem auf die Bildung von iso-Chlortetracyclin zurückgeht [17,20]. Tetracyclin, das unter den gewählten Bedingungen nahezu keiner Isomerisierung unterliegt [17], zeigte die gleiche Tendenz wie Chlortetracyclin mit abnehmender Stabilität bei steigender Temperatur und zunehmendem pH-Wert. Im Unterschied zu Chlortetracyclin wurde jedoch keine vollständige Eliminierung beobachtet und selbst bei 60 °C und einem pH-Wert von 8,0 konnten noch über 30% des eingesetzten Tetracyclins wiedergefunden werden (Abbildung 3 B). Die beobachtete Temperatur- und pH-Abhängigkeit der Stabilität sowie die Unterschiede zwischen Chlortetracyclin und Tetracyclin wurden auch in anderen Studien ermittelt [21,22].

Im Gegensatz zu Chlortetracyclin zeigte dessen Transformationsprodukt iso-Chlortetracyclin keinen deutlichen Rückgang innerhalb von 24 Stunden (Abbildung 3 C). Bei längerer Inkubation konnte jedoch eine Eliminierung festgestellt werden. Nach 10 Tagen wurden Wiederfindungsraten von 59% (40 °C), 47% (50 °C) sowie 36% (60 °C) ermittelt. Diese Ergebnisse waren unabhängig von dem pH-Wert der Lösung. Im Vergleich zur Ausgangsverbindung weist iso-Chlortetracyclin demnach eine größere Stabilität auf, unterliegt aber langfristig ebenfalls einer Eliminierung [23].

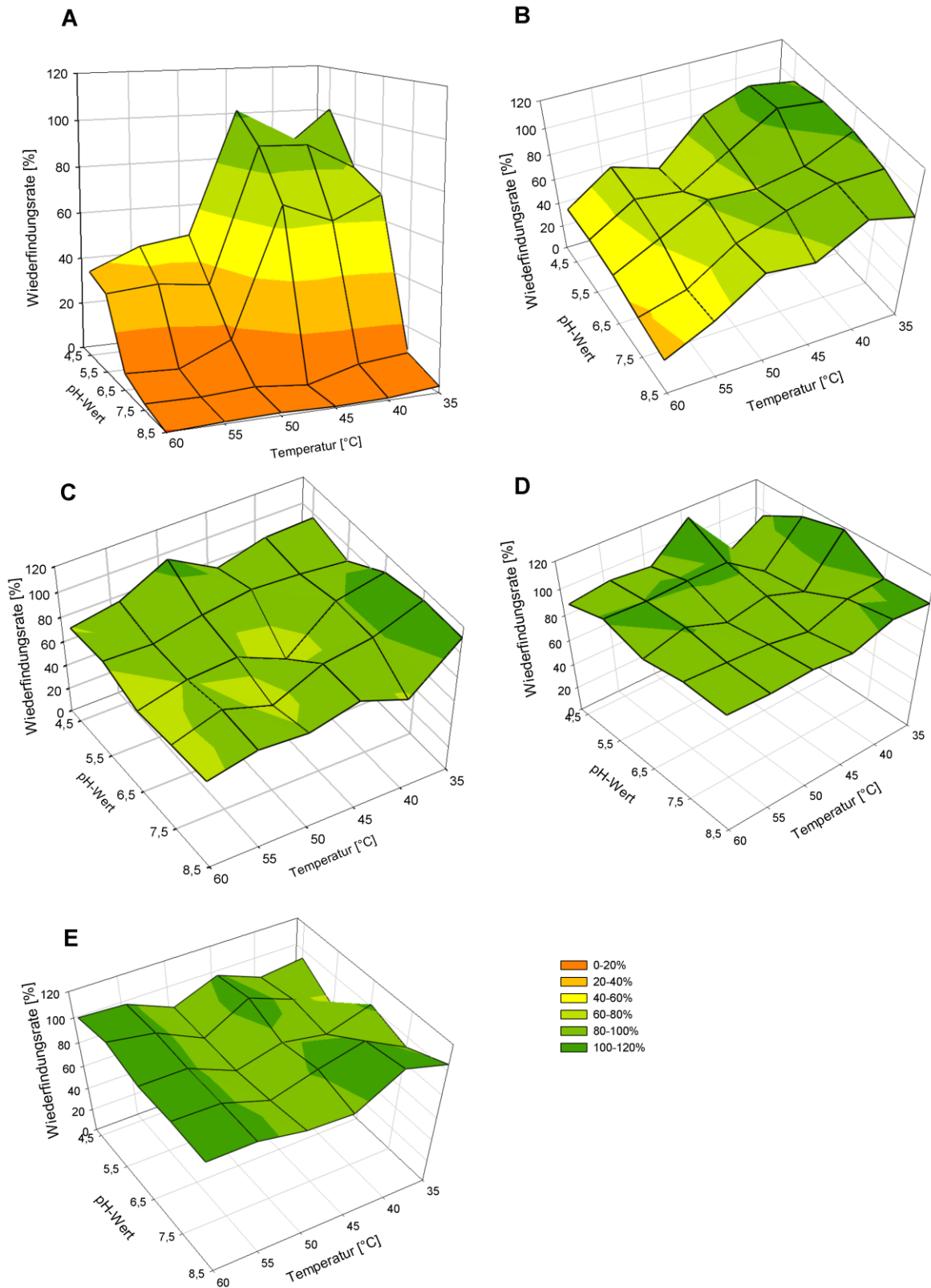


Abbildung 3: Wiederfindungsrate in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert für (A) Chlortetracyclin, (B) Tetracyclin, (C) iso-Chlortetracyclin, (D) Sulfadiazin und (E) Sulfamethazin; die Inkubation erfolgte jeweils für 24 Stunden mit einer Konzentration von 10 µM; Daten entsprechen dem Ergebnis einer Einfachbestimmung

Sowohl für Tetracyclin als auch für Chlortetracyclin konnten abiotisch gebildete Transformationsprodukte identifiziert, isoliert und strukturell charakterisiert werden. Dieser Aspekt wird in Kapitel 4 näher ausgeführt.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wäre für Tetracycline bei einer semi-kontinuierlichen Fermentation unter thermophilen Bedingungen eine höhere Eliminierung als unter mesophilen Bedingungen zu erwarten. Diese Annahme konnte jedoch nur zum Teil bestätigt werden. Als Ursache hierfür wird die in den Fermenterstudien vorhandene Feststoffmatrix angesehen, die einen stabilisierenden Effekt auf die Tetracycline auszuüben scheint (vergleiche Kapitel 3.3.2).

Im Fall der untersuchten Sulfonamide konnte keine nennenswerte Eliminierung ermittelt werden. Nach 24-stündiger Inkubation betrug der Rückgang der Analytkonzentration im Durchschnitt 3% (Abbildung 3 D und E). Nach 10 Tagen wurde eine Abnahme um weniger als 5% (40 °C, 50 °C) bzw. 10% (60 °C) verzeichnet. In der Literatur sind Studien zur Untersuchung der Hydrolyse von Sulfonamiden in wässrigen Lösungen bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen beschrieben [24]. Für Sulfamethazin wurde die höchste Eliminierung (35%) bei einer Inkubationszeit von 4 Wochen bei 70 °C und einem pH-Wert von 4 ermittelt. In den anderen Fällen (20 °C, 40 °C, pH 7) wurde ein Rückgang von weniger als 20% beobachtet. Eine weitere Studie analysierte zusätzlich den Einfluss der Ionenstärke der Inkubationslösungen. Auch hier konnte kein nennenswerter Rückgang der Sulfonamidkonzentration ermittelt werden [22].

Die Ergebnisse der Versuchsreihe zeigen, dass für die Sulfonamide keine abiotische Eliminierung aufgrund des pH-Wertes oder der Temperatur zu erwarten ist. Hydrolysereaktionen oder andere (abiotische) Transformationen sollten sowohl basierend auf den hier gewonnenen Daten als auch auf Grundlage der in der Literatur angegebenen Resultate nur zu einem sehr geringen Teil zu einer Eliminierung von Sulfadiazin und Sulfamethazin beitragen. Die in den Fermenterstudien beobachtete Eliminierung wird aus diesem Grund vor allem Sorptionsprozessen zugeschrieben (siehe Kapitel 3.3.1). Detaillierte Studien zum Sorptionsverhalten der Sulfonamide werden in Kapitel 5 erläutert.

3 Semi-kontinuierliche Fermenterstudien

3.1 Versuchsaufbau

Die Fermenterstudien wurden in 20 L Polypropylen-Gefäßen durchgeführt (Füllmenge 15 L). Zu Beginn der Inkubation wurde der Gärrest einer mesophilen oder thermophilen Biogasanlage bezogen, um eine Fermentermatrix mit etablierter Mikrobiologie zu erhalten. Die Inkubation der mesophilen Ansätze erfolgte bei 38 °C, die der thermophilen bei 55 °C. Der Fermenterinhalt wurde zur Homogenisierung pro Stunde für 15 Minuten gerührt.

Der Zusatz der Antibiotika erfolgte über einen Zeitraum von 6 Wochen. Die zugesetzten Materialien (Gülle/Maissilage bzw. Hydrolysat, Tabelle 2) wurden vor der Fermenterfütterung dotiert, um einen finalen Gehalt von 5 mg kg⁻¹ pro Sulfonamid und 10 mg kg⁻¹ pro Tetracyclin zu erhalten. Diese Werte orientierten sich an in der Literatur aufgeführten Gehalten in Gülle und Fermenterproben (siehe Übersicht in [3,4]). Die Fütterung erfolgte pro Woche an 5 Tagen nach Entnahme des Ablaufs (Tabelle 2). Für die Antibiotika-Analyse wurden pro Woche zwei Proben entnommen, die bis zur Probenvorbereitung bei -20 °C gelagert wurden (Extraktion und Analyse nach [25]).

Tabelle 2: Design und Fütterungsraten der semi-kontinuierlichen Fermenterstudien

Versuch	Temperatur	Enzyme	Gülle [mL]	Maissilage [g]	Hydrolysat [g]	Ablauf [mL]	zugesetzte oTS [g (L d) ⁻¹]
1 ^a	mesophil		490	133		476	2,8
2	mesophil				552 ^b	419	2,6
3 ^a	thermophil		490	133		476	2,8
4	thermophil				552 ^b	419	2,6
5/9	mesophil		462	66		473	2,4
6/10	mesophil	ja	462	66		473	2,4
7/11	thermophil		462	63/84		473/508	2,0
8/12	thermophil	ja	462	63/84		473/508	2,0

^a in Doppelbestimmung durchgeführt, übrige Experimente als Dreifachbestimmung, ^b das Hydrolysat bestand aus gesiebter fermentierter Gülle und Maissilage (Verhältnis 4:1); oTS - organische Trockensubstanz; Versuche 9-12 dienen als Kontrollen ohne Antibiotikazusatz und wurden parallel zu den Versuchen 5-8 durchgeführt

Vor dem Hauptversuch gab es eine vierwöchige Vorlaufphase, in der die Fermenter analog zu der Dotierungsphase fünfmal die Woche mit frischem, antibiotikafreiem Substrat versetzt wurden (Tabelle 2). Die Durchführung der sauren Hydrolyse erfolgte in einem separaten Reaktor, dessen Inhalt manuell entnommen und in den Hauptfermenter gegeben wurde. Für die Hydrolyse wurden zu Beginn 2500 g Maissilage mit 10 L antibiotikafreier fermentierter

Gülle versetzt (20 L Polypropylen-Gefäß, Füllmenge 15 L). Während der vierwöchigen Vorlaufphase wurde an 5 Tagen pro Woche ein Aliquot der hydrolysierten Maissilage entnommen und durch frisches Substrat ersetzt (500 g Maissilage und 2 Liter fermentierte Gülle). Der pH-Wert lag am Ende der Vorlaufperiode bei 5,4, so dass unter diesen Bedingungen keine nennenswerte Methanbildung zu erwarten war [12].

Bei den Versuchen 7/8 bzw. 11/12 kam es, vermutlich aufgrund einer abnehmenden Viskosität des Fermenterinhalt, im Laufe des Experiments zu der Ausbildung von Schwimmschichten. Aus diesem Grund wurde die verwendete Gülle vor dem Zusatz in den Fermenter gesiebt. Um den Anteil der zugesetzten organischen Trockensubstanz gleich zu halten, wurde der Anteil der Maissilage und dementsprechend der Ablauf erhöht (Tabelle 2).

Das Enzympräparat MiaMethan® ProCut wurde von der Firma Miavit (Essen (Oldb.), Deutschland) zur Verfügung gestellt. Der Zusatz zum Fermenter erfolgte gemäß Herstellerempfehlung mit 0,14% Enzympräparat bezogen auf das Frischgewicht der Maissilage. Die Hauptaktivität des Präparats entsprach nach Herstellerangaben einer Cellulase (Aktivität $>150 \text{ U g}^{-1}$) mit einem pH-Optimum von 6,5 bis 8,0 sowie einem Temperaturoptimum von 35 bis 60 °C.

3.2 Biogas- und Methanausbeute

Für alle Experimente konnte gezeigt werden, dass die Antibiotika-Zugabe keinen negativen Einfluss auf die Biogas- und Methanproduktion hatte (Tabelle 3). Für Sulfonamide wurde in der Literatur bei Konzentrationen bis zu 280 mg L^{-1} keine Beeinträchtigung der Biogasbildung beschrieben, wohingegen die Beobachtungen bei den Tetracyclinen stärker variierten. Für diese Verbindungen wurden für einen vergleichbaren Gehalt und Versuchsaufbau von keiner Beeinträchtigung bis hin zu einem nahezu vollständigen Erliegen der Biogasproduktion berichtet (siehe Übersicht in [3]).

Der Zusatz von Enzymen hatte keinen Effekt auf die Biogasproduktion (Versuch 6 und 8, Tabelle 3), was auch in anderen Studien mit Enzymzusatz direkt zum Fermenter beobachtet wurde [26-28]. Eine gesteigerte Biogas-/Methanproduktion wurde nur ermittelt, wenn der Enzymeinsatz mit anderen Verfahren kombiniert wurde [27] oder wenn ein zweistufiger Prozess mit der Enzymgabe zur sauren Hydrolyse eingesetzt wurde [28]. Analog zu anderen Studien wurde bei den Fermentern mit Enzymzusatz eine verringerte Viskosität beobachtet [26]. Dies spricht dafür, dass durch die Enzyme makromolekulare Strukturen abgebaut wurden. Dieser Abbau führte jedoch nicht zu einer gesteigerten Biogas- oder Methanproduktion (Tabelle 3). Für den Anlagenbetreiber könnte der Enzymeinsatz zu einem niedrigeren Energiebedarf in der Anlage führen, da aufgrund der geringeren Viskosität

weniger Energie für das Rührwerk oder für die Pumpen benötigt werden würde. Im Hinblick auf die Wirtschaftlichkeit müssten in diesem Fall die Kosten für die Enzyme mit einbezogen werden.

Tabelle 3: Kumulative Biogas- und Methanausbeute im Rahmen der semi-kontinuierlichen Fermenterstudien

Versuch	Temperatur	Enzyme	Hydrolysat	Biogas	Methan
1	mesophil			244	128
2	mesophil		ja	209 (376)	125 (141)
3	thermophil			246	129
4	thermophil		ja	238 (405)	142 (157)
5	mesophil			246	136
6	mesophil	ja		242	133
7	thermophil			243	126
8	thermophil	ja		251	129
9	mesophil			243	137
10	mesophil	ja		239	131
11	thermophil			247	129
12	thermophil	ja		246	129

Werte angegeben als L pro kg oTS; Werte sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung (Versuche 1 und 3 Doppelbestimmung); Werte in () beziehen sich auf die Summe der Gasbildung in der Hydrolyseeinheit und dem Hauptfermenter; Versuche 9-12 wurden als Kontrollen ohne Antibiotikazusatz durchgeführt

Im Fall der Fermenter mit Hydrolysat-Zugabe (Versuch 2 und 4) muss berücksichtigt werden, dass keine direkte Verbindung zwischen der Hydrolyseeinheit und dem Hauptfermenter bestand. Durch die manuelle Entnahme des Hydrolysats gingen Teile der in der Hydrolyse gebildeten Gase verloren. Hierbei handelte es sich vor allem um Wasserstoff und Kohlendioxid. Der Wasserstoff stand somit nicht für die Reduktion anderer Verbindung zu z. B. Methan zur Verfügung. Wird der Gasverlust nicht berücksichtigt, lieferte die mesophile Inkubation eine niedrigere Biogasproduktion, aber einen vergleichbaren Methanertrag (Tabelle 3). Werden die in beiden Einheiten gebildeten Gase addiert, ergibt sich für den thermophilen Ansatz eine erhöhte Biogas- und Methanausbeute, der mesophile Ansatz lieferte einen zu den anderen Versuchen vergleichbaren Methanertrag (Tabelle 3). Im Fall des Biogases muss allerdings berücksichtigt werden, dass eine Addition das Potential der Biogasproduktion überschätzt. Teile des Gases aus der Hydrolyse werden im Hauptfermenter wieder verbraucht (z. B. Wasserstoff zur Reduktion von Kohlendioxid). Für Versuch 2 und 4 konnte im Vergleich zu den anderen Ansätzen eine 3-25% höhere Methanausbeute erzielt werden, was Werten aus anderen Studien entspricht [29-31]. Ähnlich wie bei den Enzymen müssten die Anschaffungs- und Betriebskosten für die separate Hydrolyseeinheit

berücksichtigt werden. In anderen Untersuchungen wurde ein zweistufiger Prozess für verschiedene Ausgangsmaterialien getestet. Die Studie kam zu dem Schluss, dass der zweistufige Prozess nur für Substrate mit hohem Zucker-Anteil empfehlenswert sei, da Lignocellulose-haltige Substrate nur zu einem geringen Umfang in der Hydrolyseeinheit abgebaut werden könnten [32].

Eine Erhöhung der Temperatur führte zu keiner Änderung der Biogasproduktion (Versuche 3/4, 7/8 sowie 11/12, Tabelle 3). In der Literatur werden im Vergleich zu mesophilen Ansätzen sowohl gleichbleibende als auch reduzierte Methanerträge unter thermophilen Bedingungen beschrieben [33-36]. Ein entscheidender Faktor für den Einfluss der Temperatur auf die Biogas- und Methanproduktion ist die hydraulische Verweilzeit (hydraulic retention time, HRT). Höhere Temperaturen führen zu einem höheren Stoffumsatz [37,38]. Je kleiner die HRT ist, desto größer ist der Vorteil der thermophilen Inkubation gegenüber den mesophilen Bedingungen. Die HRT betrug in den hier durchgeführten Studien 40 Tage, so dass die Unterschiede hinsichtlich der Geschwindigkeit des Stoffumsatzes vermutlich wieder ausgeglichen werden konnten [36-38].

3.3 Eliminierung der Antibiotika

Für alle untersuchten Verbindungen konnte eine Eliminierung festgestellt werden. Der Umfang hing dabei von den Versuchsbedingungen ab. Die untersuchten Substanzklassen (Sulfonamide, Tetracycline) zeigten bei den jeweiligen Ansätzen ein zum Teil unterschiedliches Verhalten, weswegen eine getrennte Diskussion der Ergebnisse erfolgt.

3.3.1 Sulfonamide

Sulfadiazin und Sulfamethazin zeigten eine ähnliche Tendenz hinsichtlich der Eliminierungsraten in den jeweiligen Ansätzen. Die höchste Eliminierung wurde unter mesophilen Bedingungen mit Maissilage-Fütterung beobachtet (Versuch 1, Tabelle 4). Diese Eliminierungsraten waren größer als die Raten bei Fütterung von Hydrolysat (Versuch 2). Die Raten von Versuch 1 und 2 waren größer als die Raten der übrigen Versuche (3-8), bei denen keine Unterschiede beobachtet wurden.

Es wurden zwei mesophile Ansätze mit Maissilage-Zusatz durchgeführt (Versuch 1 und 5/6). Diese Versuche unterschieden sich lediglich in der zugesetzten Silagemenge (133 und 66 g, Tabelle 2). Die doppelte Menge an zugesetztem Feststoff führte zu einem Anstieg der Eliminierungsraten um Faktor 1,65 bis 1,80 (Tabelle 4). Bei der thermophilen Inkubation im Versuch 3 wurde die gleiche Menge Maissilage verwendet wie bei Versuch 1, aber im

Vergleich zu Versuch 5 wurde kein Unterschied festgestellt (Tabelle 4). Diese Ergebnisse legen nahe, dass für die untersuchten Sulfonamide Sorption der wichtigste Eliminierungsweg im Rahmen der anaeroben Fermentation ist. Maissilage verfügt über eine große Oberfläche, an der Sorptionsprozesse möglich sind. Folglich führt ein höherer Zusatz von Maissilage zu einer höheren Eliminierung. Diese Eliminierung kann aufgrund von Physisorption (Adsorption auf der Oberfläche) oder Chemisorption (Ausbildung einer kovalenten Bindung) stattfinden, wobei beide Prozesse temperaturabhängig sind. Adsorption ist ein exothermer Prozess [39]. Dies erklärt die niedrigeren Eliminierungsraten unter thermophilen Bedingungen mit hohem Maissilageanteil (Versuch 3) im Vergleich zur mesophilen Inkubation (Versuch 1) (Tabelle 4).

Tabelle 4: Eliminierungsraten der untersuchten Antibiotika in Abhängigkeit von dem Versuchsaufbau

Versuch	Feststoffanteil* [%]	SDZ	SMZ	TC	CTC	CTC + isoCTC
1	21	56	63	44	75	41
2	20	48	52	36	68	35
3	21	32	40	43	91	47
4	20	32	37	31	83	42
5	12	32	38	21	61	22
6	12	31	38	19	61	23
7	13/17	27	41	45	86	41
8	13/17	26	38	39	83	33

Eliminierungsraten angegeben in %, Werte zeigen den Mittelwert der letzten drei Probennahmetage; für den Aufbau der verschiedenen Versuche siehe Tabelle 2; * Angabe bezieht sich auf den Anteil Maissilage in der Fermenterfütterung (Hydrolysat bzw. Gülle plus Maissilage); CTC - Chlortetracyclin, isoCTC - iso-Chlortetracyclin, SDZ - Sulfadiazin, SMZ - Sulfamethazin, TC - Tetracyclin

Ein abiotischer Abbau der Sulfonamide wird aufgrund der Ergebnisse der Inkubationsversuche in wässrigen Lösungen in keinem großen Umfang erwartet (vergleiche Kapitel 2, Abbildung 3 D und E). Ein biotischer Abbau wird im Hinblick auf Ergebnisse anderer Fermenterstudien ebenfalls als wenig wahrscheinlich angesehen. Für Sulfamethazin wurde in batch-Fermenterstudien keine Eliminierung festgestellt [40,41]. Bei diesem Versuchsaufbau wird den Fermentern keine oder nur einmalig Maissilage zugeführt, so dass nur wenige Sorptionsstellen für eine Eliminierung zur Verfügung stehen. Darüber hinaus werden durch die Interaktion der Maissilage mit der Güllematrix Sorptionsstellen blockiert und/oder abgebaut (vergleiche Kapitel 5.2.3), was wiederum eine niedrigere Eliminierung zur Folge hat. Bei der Inkubation von Sulfadiazin und Sulfamethazin sowohl in biologisch aktiver als auch inaktiver Matrix wurden keine Unterschiede hinsichtlich der Eliminierung der

Substanzen festgestellt [40]. Dies unterstützt die Annahme, dass die Eliminierung nicht durch biotische, sondern durch abiotische Prozesse wie Sorption erfolgt.

Neben dem direkten Zusatz von Maissilage erfolgte eine Vorbehandlung des Substrats im Rahmen einer sauren Hydrolyse (Versuch 2 und 4). Im Fall der mesophilen Inkubation führte dies zu einem Rückgang der Eliminierungsrate (Versuch 1 im Vergleich zu Versuch 2, Tabelle 4, Abbildung 4 A bis D). Durch die saure Hydrolyse müssen somit Änderungen der Oberflächenbeschaffenheit der Maissilage stattgefunden haben, die zu einer verringerten Sorption führten. Unter thermophilen Bedingungen hatte die Hydrolyse keinen Einfluss auf die Eliminierung (Tabelle 4, Abbildung 4 A bis D). Die erhöhte Temperatur und die damit veränderte Sorptionskinetik wirkten wahrscheinlich dem Effekt der Maissilage-Behandlung entgegen, so dass in Versuch 3 und 4 vergleichbare Eliminierungsraten für die Sulfonamide gefunden wurden.

Bei den Fermentern mit Enzymzusatz (Versuch 6 und 8) konnte eine verringerte Viskosität beobachtet werden, was für einen Abbau von Makromolekülen bzw. makromolekularen Strukturen durch die Enzyme spricht. Diese Veränderungen der Struktur hatten jedoch keinen Einfluss auf die Sulfonamid-Eliminierung im Vergleich zu den Versuchen ohne Enzymzusatz (Versuch 5 und 7, Tabelle 4). Die Strukturänderungen müssen somit geringer und/oder anders ausfallen als die durch eine saure Hydrolyse hervorgerufenen Effekte.

Bei allen Versuchen wurde für Sulfamethazin eine höhere Eliminierungsrate festgestellt als für Sulfadiazin (Tabelle 4). Die Sorption von Sulfonamiden wurde für verschiedene Feststoffmatrices untersucht wie zum Beispiel (Bio-)Kohle. Für diese Matrix wurden Sorptionsmechanismen wie π - π -Wechselwirkungen oder ladungsassoziierte Wasserstoffbrückenbindungen (charge-assisted H-bonds) beschrieben. Die Sorption erfolgte vor allem durch neutrale Moleküle [39,42]. Sulfamethazin weist einen höheren pKs-Wert als Sulfadiazin auf (7,4 im Vergleich zu 6,4; [43]). Da der pH-Wert des Fermenterinhalt zwischen 7,5 und 8,1 lag, konnte eine Sorption im Fall von Sulfamethazin im größeren Umfang stattfinden.

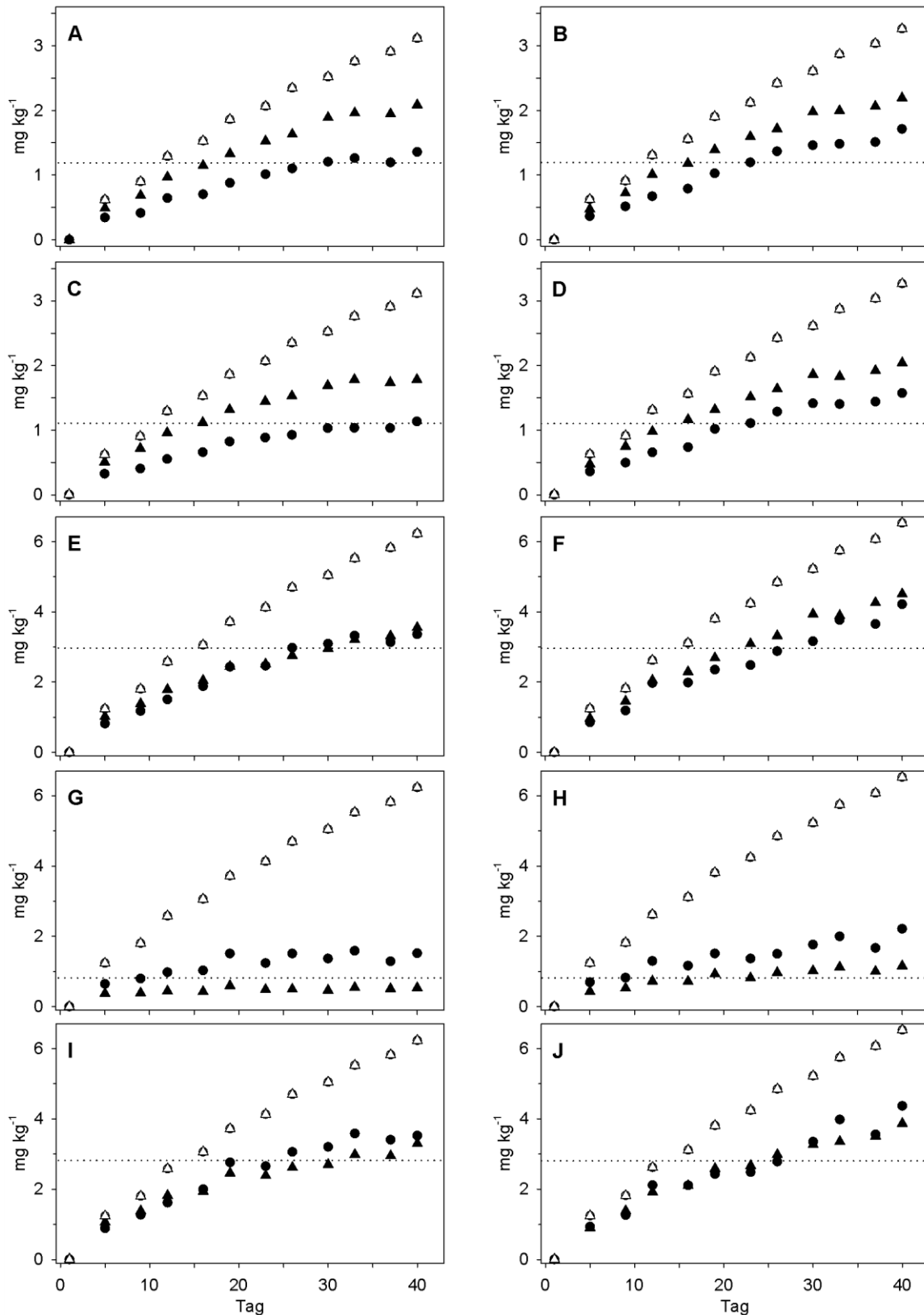


Abbildung 4: Berechnete (O,Δ) und gemessene (●,▲) Gehalte von (A,B) Sulfadiazin, (C,D) Sulfamethazin, (E,F) Tetracyclin, (G,H) Chlortetracyclin und (I,J) Summe von (iso-)Chlortetracyclin in Fermentern unter mesophilen (O,●) und thermophilen (Δ,▲) Bedingungen; linke Spalte zeigt Zusatz von Maissilage (Versuche 1 und 3), rechte Spalte zeigt Zusatz von Hydrolysat (Versuche 2 und 4); Gehalte beziehen sich auf mg pro kg Feuchtgewicht; die gepunktete Linie dient der Orientierung; aufgrund unterschiedlicher Fütterungsraten unterscheiden sich die theoretischen Werte der linken und rechten Spalte um 4,7% (siehe Tabelle 2)

3.3.2 Tetracycline

Die Ergebnisse für Chlortetracyclin und Tetracyclin waren weniger einheitlich als die Resultate der Sulfonamide. Im Unterschied zu Sulfonamiden weisen Tetracycline höhere Sorptionskoeffizienten und eine verringerte Temperaturstabilität auf. Außerdem unterliegen sie weiteren Reaktionen wie Epimerisierung und Isomerisierung, was unterschiedliche Auswirkungen der verschiedenen Prozessparameter zur Folge hat. Vor allem Chlortetracyclin unterliegt unter alkalischen Bedingungen einer schnellen Isomerisierung, so dass die Summe von Chlortetracyclin und iso-Chlortetracyclin ebenfalls berücksichtigt wurde.

Für alle Tetracycline wurde für den mesophilen Ansatz mit kleinerem Maissilage-Zusatz (Versuch 5 und 6, Tabelle 4) die niedrigste Eliminierungsrate gefunden. Analog zu den Sulfonamiden hatte der Einsatz von Enzymen keinen Einfluss auf die Eliminierung. Unter thermophilen Bedingungen stieg die Eliminierungsrate um 10 bis 25 Prozentpunkte an (Versuch 7 und 8, Tabelle 4). Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen abiotischer Inkubationen überein, bei denen mit steigender Temperatur eine geringere Stabilität für Tetracycline beschrieben wurde (Kapitel 2, Abbildung 3 A und B, [21-23]).

Für die Versuche 1 bis 4 wurde bei Chlortetracyclin eine höhere Eliminierungsrate unter thermophilen Bedingungen ermittelt. Tetracyclin zeigte hingegen vergleichbare Werte bei den zwei getesteten Temperaturen (Tabelle 4, Abbildung 4 E-H). Diese Daten könnten eine leichtere Abbaubarkeit von Chlortetracyclin suggerieren. Die Eliminierung geht jedoch überwiegend auf die Isomerisierung von Chlortetracyclin zu iso-Chlortetracyclin zurück. Diese Reaktion stellt eine abiotische Transformation dar, die durch höhere pH-Werte und Temperaturen gefördert wird (Kapitel 2, Abbildung 3 A) [17]. Untersuchungen von Chlortetracyclin sollten aus diesem Grund immer die Analyse von iso-Chlortetracyclin einschließen, um ein vollständiges Bild über den Verbleib der Substanz zu erhalten. Tetracyclin und die Summe von (iso-)Chlortetracyclin zeigten ein ähnliches Verhalten in den Versuchen 1 bis 4, was eine vergleichbare Stabilität der Tetracycline im Fermentationsprozess nahelegt (Tabelle 4, Abbildung 4 E, F sowie I, J).

Analog zu den Sulfonamiden, wurde im Fall der Tetracycline unter mesophilen Bedingungen bei höherem Maissilage-Zusatz (Versuch 1) eine höhere Eliminierung ermittelt (vgl. Versuch 1 und 5/6, Tabelle 4). Dies spricht für eine Eliminierung durch Sorption. Tetracycline zeigen eine starke Sorption an Bodenmatrices. Der Zusatz von Boden zu wässrigen Tetracyclin-Lösungen führte zu einer nahezu vollständigen Eliminierung (Tabelle 19). Die Sorption von Tetracyclinen an Bodenpartikel erfolgt innerhalb kürzester Zeit (Sekunden bis Minuten) [21]. Bei der Inkubation in Gülle mit verschiedenen Feststoffanteilen (matrixeigener Feststoff) wurden für Tetracyclin Sorptionskoeffizienten (K_D) von 2,9 bis 5,7 bestimmt. Sulfonamide zeigten hingegen K_D -Werte von 0,88 bis 1,44 [44]. Die Sorptionsneigung ist bei Tetracyclinen

demnach stärker ausgeprägt als bei Sulfonamiden. Dies wird als Ursache dafür angesehen, dass die thermophilen Bedingungen bei den Tetracyclinen zu keiner Abnahme der Eliminierungsraten führten (Tabelle 4, Abbildung 4 E,F und I,J).

Der Einsatz von Hydrolysat führte zu einer verringerten Eliminierung (Tabelle 4). Im Fall der mesophilen Inkubation spräche dies, wie bei den Sulfonamiden (siehe 3.3.1), für eine geringere Sorption der Tetracycline auf der Hydrolysoberfläche. Im Gegensatz zu den Sulfonamiden waren die Unterschiede auch bei thermophilen Bedingungen zu beobachten. Sollte eine verringerte Sorption auf der Oberfläche stattfinden, wäre aufgrund der Temperaturinstabilität eine höhere Eliminierung der Verbindungen zu erwarten. Insbesondere die Ergebnisse für Chlortetracyclin widersprechen einer verringerten Sorption, da in diesem Fall eine verstärkte Isomerisierung stattgefunden hätte, was wiederum eine gesteigerte Eliminierungsrate nach sich gezogen hätte. In wässriger Lösung wurde für Chlortetracyclin innerhalb von 24 Stunden eine nahezu vollständige Eliminierung beobachtet (Kapitel 2, Abbildung 3 A), wohingegen in den Fermenterstudien bis zu 40% des theoretischen Gehaltes nach 42 Tagen detektiert wurden (Tabelle 4, Abbildung 4 G, H). Offensichtlich führt eine Sorption der Tetracycline an der Feststoffmatrix zu einer Stabilisierung der Verbindungen, die in dieser Form in rein wässrigen Lösungen nicht erfolgen kann. Es wird vermutet, dass diese Sorption im Rahmen der Probenvorbereitung im Fall der Hydrolysat-haltigen Proben besser überwunden werden konnte als die Sorption auf der Maissilage. Dadurch wurden in den Versuchen mit Hydrolysatzusatz (Versuch 2 und 4) niedrigere Eliminierungsraten ermittelt als in den Versuchen mit dem Zusatz von unbehandelter Maissilage (Versuch 1 und 3) (Tabelle 4).

3.4 Zusammenfassung

Anhand verschiedener Faktoren (Enzymzusatz, Temperatur, vorgeschaltete saure Hydrolyse) wurde der anaerobe Fermentationsprozess in semi-kontinuierlich betriebenen Fermentern variiert und der Einfluss auf die Biogas-/Methanbildung sowie die Eliminierung verschiedener Veterinärantibiotika untersucht.

Der Gasertrag der jeweiligen Ansätze wurde nicht von der Anwesenheit der Antibiotika beeinträchtigt. Der einstufige Prozess mit mesophiler Inkubation repräsentiert die Bedingungen der Mehrzahl der in Deutschland installierten Biogasanlagen. Hinsichtlich des Methanertrags lieferte dieser Prozess Ergebnisse, die mit den meisten anderen Ansätzen vergleichbar waren. Lediglich für einen zweistufigen Prozess kombiniert mit thermophilen Bedingungen im Hauptfermenter wurde ein positiver Effekt auf die Methanausbeute beobachtet. Dieses Verfahren ist jedoch mit höheren Kosten verbunden (Installation und Wartung einer zusätzlichen Anlage, ggf. Beheizen des Hauptfermenters), die unter

Umständen durch den nur leicht gestiegenen Methanertrag nicht ausgeglichen werden. Der Zusatz von Enzymen zur Verringerung der Viskosität des Fermenterinhalt könnte, in Abhängigkeit von den eingesetzten Substraten, zu einem geringeren Energiebedarf der Anlagen führen, bringt aber keine Vorteile hinsichtlich des Gasertrages.

Die Ergebnisse der Sulfonamide und Tetracycline zeigen, dass die Eliminierung der untersuchten Antibiotika ein komplexer Prozess ist, der von verschiedenen Faktoren abhängt. Die für die Standardlösungen erhaltenen Daten (Kapitel 2) konnten in der Fermentermatrix nicht bestätigt werden. Vielmehr beeinflussen die zugesetzten Feststoffe, in Form von Maissilage bzw. Hydrolysat, den Verbleib der Antibiotika. Sulfonamide zeigten im Vergleich zu den feststofffreien Standardlösungen eine höhere Eliminierung, wohingegen die Tetracycline offensichtlich stabilisiert und in einem geringeren Umfang eliminiert wurden. Vor diesem Hintergrund werden Sorptionsprozesse als der wichtigste Eliminierungsweg angesehen. Diese Prozesse wurden in verschiedenen Sorptionsstudien genauer untersucht (siehe Kapitel 5).

4 Transformationsprodukte

4.1 Eliminierung von Tetracyclin

4.1.1 Verhalten in Salzlösungen

Im Zuge der Inkubationsversuche in wässrigen Lösungen (Kapitel 2) wurde für Tetracyclin ein Rückgang der Konzentration verzeichnet (Abbildung 3 B). In den dazugehörigen UV-Chromatogrammen konnten keine neuen Peaks identifiziert werden, was wahrscheinlich mit der vergleichsweise niedrigen Konzentration von 10 μM zusammenhing. Aus diesem Grund wurde die Inkubation mit höheren Konzentrationen wiederholt (10 bis 2000 μM). Da Tetracyclin als Hydrochlorid eingesetzt wurde, erfolgte die Inkubation in Phosphatpufferlösung (100 mM, pH-Wert 8,0 sowie 6,5), um einen stabilen pH-Wert während der Inkubation zu gewährleisten.

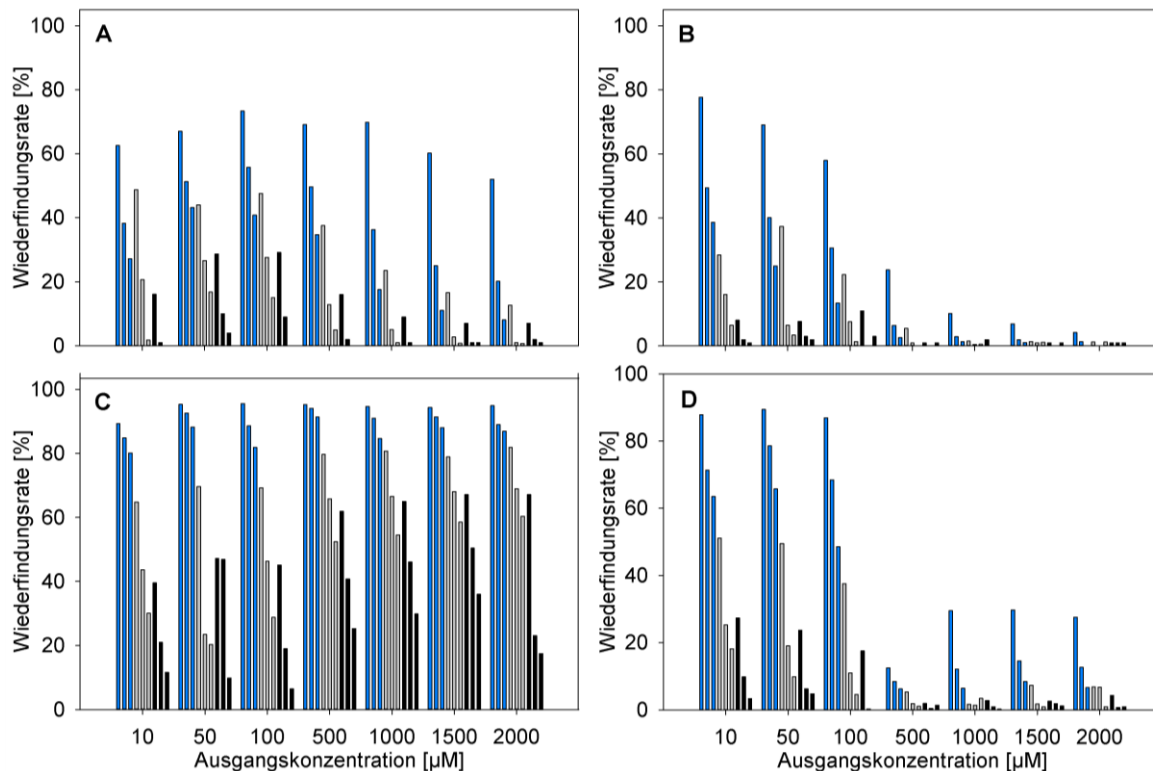


Abbildung 5: Inkubation von Tetracyclin in (A,B) 100 mM Phosphatpuffer sowie (C,D) 1 mM Phosphatpuffer mit (A,C) pH 6,5 und (B,D) pH 8,0; Inkubation erfolgte bei 40 °C (blau), 50 °C (grau) sowie 60 °C (schwarz); Balken gleicher Farbe zeigen von links nach rechts das Messergebnis nach 24, 48 und 72 Stunden; Ergebnisse entsprechen einer Einfachbestimmung

Die anschließende Analyse der Proben konnte die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen jedoch nicht bestätigen. Vielmehr kam es zu einer deutlich höheren Eliminierung der Substanz, die bei höheren Ausgangskonzentrationen stärker ausfiel als bei geringer konzentrierten Proben. Darüber hinaus trat eine höhere Eliminierung bei dem

höheren pH-Wert auf (Abbildung 5 A und B). Die Inkubation wurde daraufhin mit einem geringer konzentrierten Puffer (1 mM) wiederholt. Für einen pH-Wert von 6,5 entsprachen die Ergebnisse nach 24 Stunden den Daten aus der Inkubation in Reinstwasser (vergleiche Abbildung 3 B und Abbildung 5 C). Bei einem pH-Wert von 8,0 zeigten die Proben eine höhere Wiederfindung als die Proben mit einer Pufferkonzentration von 100 mM, die Eliminierung blieb aber vor allem für die konzentrierten Proben auf einem hohen Niveau (Abbildung 5 D).

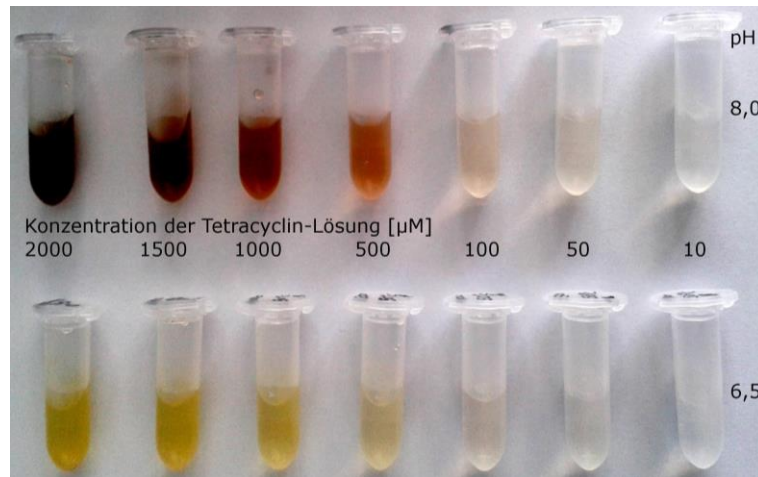


Abbildung 6: Verfärbung der Tetracyclin-Proben in 1 mM Phosphatpuffer bei 60 °C nach dreitägiger Inkubation

Die Proben zeigten eine intensive rote Färbung (pH 8,0) bzw. eine starke Gelbbraunfärbung (pH 6,5) (Abbildung 6). Tetracyclin-Lösungen selbst sind, abhängig von der Konzentration, blassgelb bis zitronengelb gefärbt. Die Farben der Proben waren durch Änderung des pH-Wertes reversibel ineinander überführbar, was auf eine Indikatorfunktion des neu gebildeten Moleküls (bzw. der Moleküle) hindeutete.

Messungen mittels HPLC-UV ergaben die Bildung einer neuen Verbindung, die nach Tetracyclin eluierte (Transformationsprodukt 1, Abbildung 7). Die iso-Verbindungen der Tetracycline eluieren vor der Ausgangssubstanz (vergleiche Abbildung 12), so dass die Isomerisierung von Tetracyclin ausgeschlossen wurde. Unter sauren Bedingungen (pH 3,0-6,5) wird die Bildung von Anhydro-Tetracyclinen begünstigt [17]. Um auszuschließen, dass es sich bei der neuen Verbindung um Anhydro-Tetracyclin handelte, wurde eine Standardlösung von dieser Substanz mit der gleichen Methode untersucht. Ein Vergleich der Retentionszeiten ergab, dass das Transformationsprodukt 1 eine andere Struktur aufweisen muss (Abbildung 7).

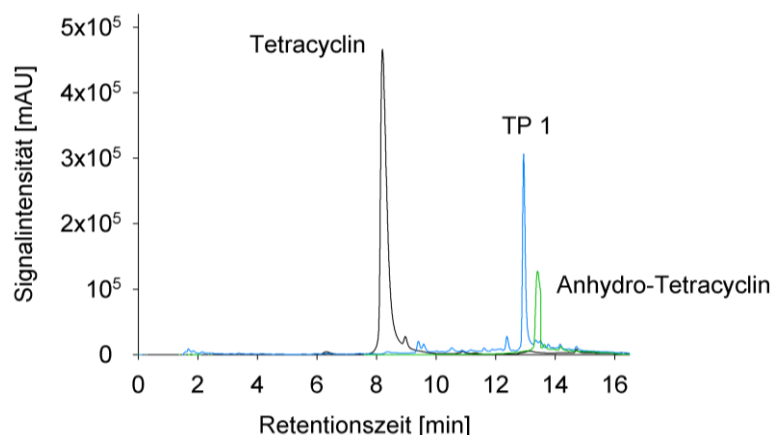


Abbildung 7: HPLC-UV-Chromatogramm einer Standardlösung von Anhydro-Tetracyclin (grün) und Tetracyclin (schwarz) sowie einer Tetracyclin-Probe nach 24-stündiger Inkubation in 1 mM Phosphatpuffer (pH 8,0, 60 °C) (blau); TP - Transformationsprodukt

Da sich die Ergebnisse der Inkubation in Phosphatpuffer von denen der Inkubation in Reinstwasser unterschieden, wurde ein Einfluss der Phosphat-Ionen auf die Eliminierung vermutet. Um diesen Zusammenhang näher zu untersuchen, wurde Tetracyclin in Salzlösungen verschiedener Konzentrationen (10 und 100 mM) ohne und mit Phosphat inkubiert (1 mM) (Tabelle 5). Die Inkubation erfolgte bei 55 °C, die Lösungen wurden jeweils auf pH 8,0 eingestellt. Um den Einfluss des pH-Wertes zu überprüfen, wurde für die 10 mM Salzlösungen von NaCl und CaCl₂ zusätzlich ein pH-Wert von 6,0 getestet.

Tabelle 5: Wiederfindungsraten von Tetracyclin nach 24-stündiger Inkubation in Salzlösungen

Matrix	ohne Phosphat		mit Phosphat					
	10 mM	100 mM	10 mM	100 mM				
NaCl	40	+	34	+	18	+++	19	+++
NaCl pH 6,0	72	+			69	+		
NaNO ₃	36	+	35	+	19	+++	20	+++
Na ₂ SO ₄	20	+	12	+	13	+++	8	+++
KCl	32	+	31	+	21	+++	19	+++
KNO ₃	31	o	33	+	20	+++	19	+++
K ₂ SO ₄	32	+	28	+	20	+++	18	+++
CaCl ₂	74	o	73	o	58	o	70	o
CaCl ₂ pH 6,0	79	+			71	+		
Ca(NO ₃) ₂	73	o	79	o	64	o	79	o
MgSO ₄	69	o	76	o	67	o	74	o
NaCH ₃ COO	23	+	16	+	18	+	17	+

Angaben in % als Ergebnis einer Einfachbestimmung; Symbole kennzeichnen die Intensität des Peaks (Peakfläche [V * min]) des neu gebildeten Transformationsproduktes 1 mit „o“ Peakfläche < 50.000, „+“ Peakfläche bis 250.000, „+++“ Peakfläche bis 500.000 sowie „+++“ Peakfläche >500.000; die Phosphat-Konzentration betrug 1 mM

Im Fall der einwertigen Kationen waren die Ergebnisse der Salzlösungen ohne Phosphat vergleichbar mit den Daten der Inkubation in Reinstwasser unter ähnlichen Bedingungen

(vergleiche Tabelle 5 und Abbildung 3 B). Die Salzkonzentration hatte dabei keinen Einfluss auf die Wiederfindung. Durch den Zusatz von Phosphat kam es zu einer deutlichen Verringerung der Wiederfindungsrate. Gleichzeitig nahm die Peakfläche des Transformationsproduktes 1 zu (Tabelle 5). Eine Absenkung des pH-Wertes hatte im Fall der NaCl-Lösung eine deutlich geringere Eliminierung des Tetracyclins sowie eine verringerte Bildung des Transformationsproduktes 1 zur Folge.

Bei dem Einsatz von Salzen zweiwertiger Kationen ergab sich ein anderes Bild. Hier lag die Wiederfindungsrate bei 58-79%, unabhängig von der Anwesenheit von Phosphat und dem pH-Wert (Tabelle 5). Die Kationen üben demnach einen stabilisierenden Effekt auf Tetracyclin aus. Tetracycline sind dafür bekannt, Komplexe mit zweiwertigen Kationen zu bilden. Die Koordination ist dabei an mehreren Punkten im Molekül möglich (Abbildung 8). Die Komplexbildung kann über den A-Ring [45], das Ringsystem BCD [46,47] oder über beide Bereiche erfolgen [48-51].

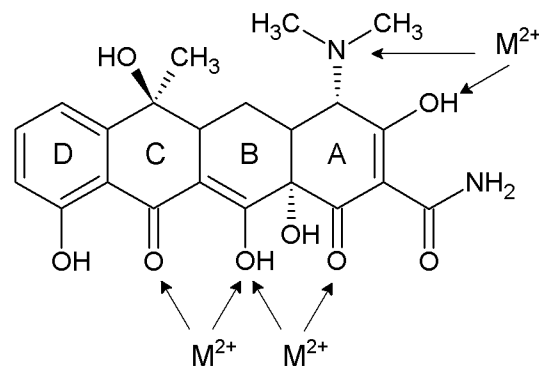


Abbildung 8: Potentielle Bindungsstellen zur Komplexbildung von Tetracyclin mit zweiwertigen Metallionen (M^{2+})

Die Assoziationskonstante des Tetracyclin- Ca^{2+} -Komplexes nimmt mit steigendem pH-Wert zu. Darüber hinaus verlagert sich die Assoziierungsstelle vom A-Ring (pH 5,0) hin zum BCD-Ringsystem (pH 9,0) [48]. Wahrscheinlich konnte aufgrund dieser Verlagerung das Transformationsprodukt 1 trotz der Anwesenheit der Calciumionen bei einem pH-Wert von 6,0 gebildet werden (Tabelle 5). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass eine Änderung der Molekülstruktur im Bereich des BCD-Ringsystems stattfindet.

Die Ergebnisse für die zweiwertigen Ionen können eine Erklärung dafür sein, dass die Eliminierung der Tetracycline in den Fermenterstudien geringer ausfiel als bei der Inkubation in Reinstwasser (vergleiche Tabelle 4 und Abbildung 3 B). Gülle und Gärreste enthalten zweiwertige Kationen in Form von Magnesium und Calcium (Tabelle 6). Diese können eine Stabilisierung der Moleküle in der komplexen Matrix bewirken.

Tabelle 6: Magnesium- und Calciumgehalte in Wirtschaftsdüngern

Matrix	MgO	CaO
Rindergülle dünn	0,6	1,2
Rindergülle normal	0,8	1,6
Rindergülle dick	1,0	2,0
Schweinegülle dünn	0,3	0,8
Schweinegülle normal	0,6	1,5
Schweinegülle dick	0,9	2,3
Biogassubstratrest (4-6% TS)	0,6	
Biogassubstratrest (6-8% TS)	0,8	

Angaben in kg t^{-1} bzw. kg m^{-3} Frischmasse; TS - Trockensubstanz; Daten entnommen aus [52]

4.1.2 Strukturaufklärung

Für die Isolierung des Transformationsproduktes 1 wurde Tetracyclin für 48 Stunden bei $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 10 mM Phosphatpuffer ($\text{pH } 8,0$) inkubiert. Die Ausgangskonzentration betrug 50 mg L^{-1} in einem Gesamtansatz von 1000 mL . Anschließend erfolgte eine Anreicherung mittels Festphasenextraktion (SPE). Die Extrakte wurden in drei Schritten mit Hilfe der präparativen HPLC gereinigt. Das Produkt wurde als tiefrotschwarze Flüssigkeit gewonnen, die sich in Wasser, jedoch nicht in Methanol lösen ließ. Die Auswaage betrug am Ende der Aufreinigung $6,46\text{ mg}$.

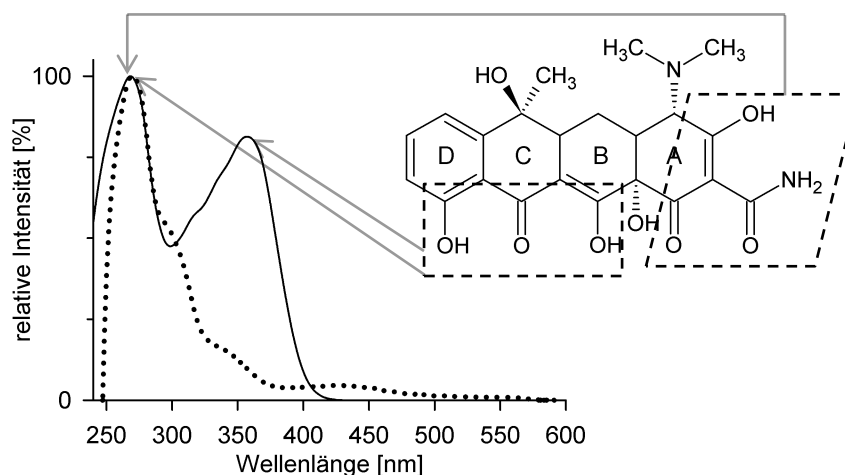


Abbildung 9: UV/VIS-Spektren von Tetracyclin (durchgezogene Linie) und dem Transformationsprodukt (gepunktete Linie); Angabe der für die Absorptionsmaxima verantwortlichen Chromophore nach [53]

Die Aufnahme der UV/VIS-Spektren von Tetracyclin und dem Transformationsprodukt 1 erfolgte mit Hilfe der HPLC und Diodenarray-Detektor (DAD) (Abbildung 9). Das Absorptionsmaximum im Bereich von 270 nm geht sowohl auf das Chromophor am Ring A als auch auf das Chromophor am Ringsystem BCD zurück. Das Maximum im Bereich von 360 nm resultiert nur aus dem BCD-Ringsystem [53]. Da dieses Absorptionsmaximum beim

Transformationsprodukt 1 nicht mehr vorhanden ist, bestätigt dies die Annahme, dass eine strukturelle Änderung in diesem Bereich stattgefunden hat.

Für die Ermittlung der Summenformel wurden Messungen mittels hochauflösender Massenspektrometrie vorgenommen. Sowohl im negativen Modus (m/z 386,0870 als $[M-H]^-$, -2,8 ppm) als auch im positiven Modus (m/z 410,0856 als $[M+Na]^+$, +2,4 ppm) ergab sich eine Summenformel von $C_{19}H_{17}NO_8$. Im Vergleich zu Tetracyclin ($C_{22}H_{24}N_2O_8$) bedeutet dies einen Unterschied von C_3H_7N , der aufgrund des Fragmentierungsmusters in erster Linie auf die Abspaltung der Dimethylaminogruppe zurückgeführt werden konnte. Die Analyse mithilfe verschiedener 1D- und 2D-NMR-Techniken ergab die in Abbildung 10 gezeigte Struktur.

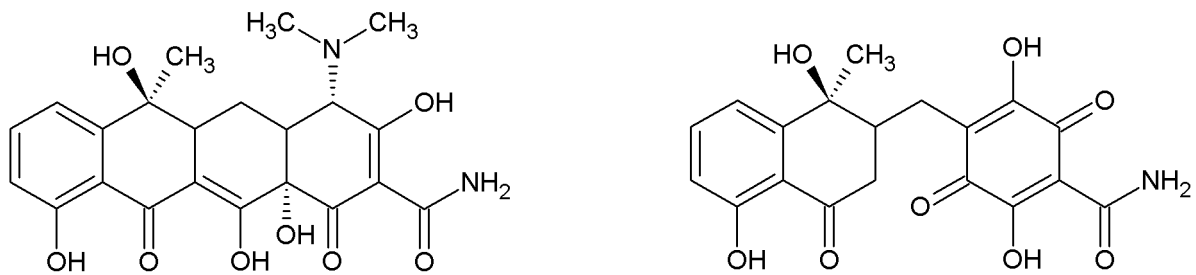


Abbildung 10: Struktur von Tetracyclin (links) und Transformationsprodukt 1 (*seco*-Cyclin A) (rechts)

Die Verbindung wurde als Biotransformationsprodukt für Pilzkulturen beschrieben und von den Autoren als *seco*-Cyclin A benannt [54]. Die Inkubationsstudien in verschiedenen Salzlösungen haben jedoch gezeigt, dass die Verbindung auch auf abiotischem Weg innerhalb von 24 Stunden gebildet werden kann (Tabelle 5).

Die antibiotische Wirksamkeit der Tetracycline hängt maßgeblich von ihrer Struktur ab. Eine Ringöffnung und damit eine Unterbrechung der vier anellierten Ringe oder eine Abspaltung der Dimethylaminogruppe führen zu einer deutlichen Abnahme der Wirksamkeit [55,56]. Die erwähnten Punkte treffen auf Transformationsprodukt 1 zu, so dass hier mit einer reduzierten antibiotischen Wirksamkeit zu rechnen war. Die Aktivität wurde in einem Hemmstofftest getestet (BRT MRL-Suchtest, zur Verfügung gestellt von AiM GmbH, München), der für die Analyse von Hemmstoffen in Milch optimiert wurde. Als Testorganismus dient *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953, der auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert ist. Neben Transformationsprodukt 1 wurde auch Tetracyclin untersucht. Als Positivkontrolle diente Penicillin G ($4 \mu\text{g L}^{-1}$). Die Kavität der Positivkontrolle bleibt bis zum Ende der Inkubation blau gefärbt. Als Negativkontrolle wurde hemmstofffreie Milch verwendet. Eine Gelbfärbung dieser Kavität zeigt das Ende der Inkubation an (vollständiger Umsatz des Farbstoffs durch den Testorganismus).

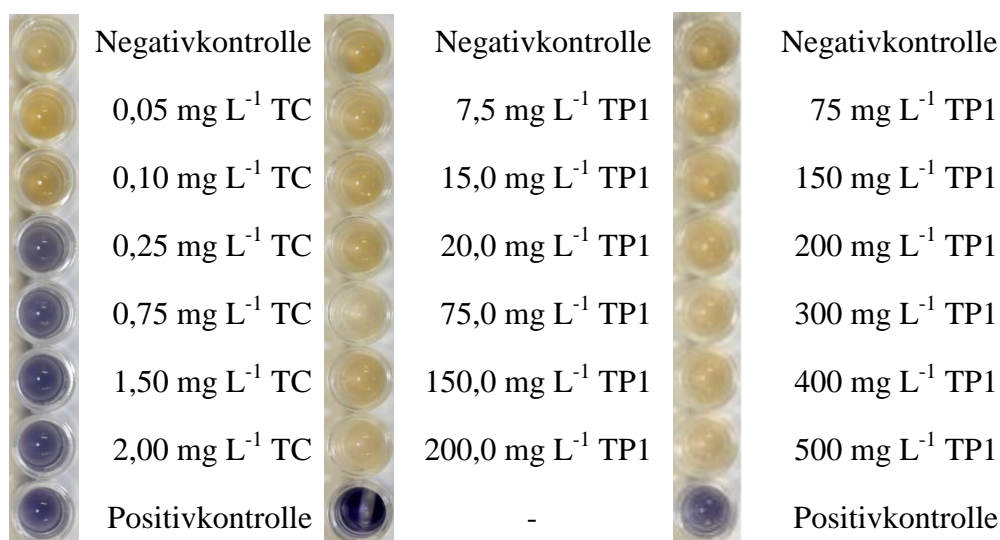


Abbildung 11: Hemmstofftest von Tetracyclin und dessen Transformationsprodukt (TP1) *seco*-Cyclin A

Der Hemmstoff-Nachweis gilt als positiv, wenn die Kavität der Testsubstanz die gleiche Verfärbung wie die Positivkontrolle aufweist [57]. Bei Tetracyclin war dies ab einer Konzentration von 0,25 mg L⁻¹ der Fall. Im Unterschied dazu wurde bei Transformationsprodukt 1 selbst bei einer Konzentration von 500 mg L⁻¹ keine Hemmung beobachtet (Abbildung 11). Dies bestätigt die Relevanz der im Transformationsprodukt 1 fehlenden Struktureinheiten (Dimethylaminogruppe, anelliertes Ringsystem) für die antibiotische Wirksamkeit der Tetracycline. Bei den vorliegenden Änderungen der Struktur ist von einer Irreversibilität der Transformation auszugehen. Die Bildung von Transformationsprodukt 1 stellt somit einen Eliminierungsweg dar, der keine antibiotisch wirksame Substanz hinterlässt (Unterschied zu *iso*-Chlortetracyclin, Abbildung 14, [17]) oder der zu einer erneuten Bildung der Ausgangsverbindung führen kann (Beispiel Deacetylierung acetylierter Verbindungen, [58]).

4.2 Eliminierung von Chlortetracyclin

Analog zu Tetracyclin wurden Inkubationen von Chlortetracyclin in Phosphatpuffer-Lösungen vorgenommen. Aufgrund des pH-Wertes von 8,0 findet bei Chlortetracyclin eine schnelle Isomerisierung statt [17]. Dies war auch an einem Farbwechsel der inkubierten Lösung zu erkennen. Die zitronengelbe Farbe des Chlortetracyclins verschwand innerhalb weniger Stunden, so dass die Lösung nur noch eine schwache gelbe Färbung aufwies. Diese Farbänderung geht auf das Verschwinden des BCD-Ringsystems zurück (vergleiche auch Abbildung 2 und Abbildung 9) [20]. Im weiteren Verlauf der Inkubation wechselte die Farbe zu einem Orangeton, der ähnlich bei der Inkubation von Tetracyclin beobachtet worden war.

Messungen mittels HPLC-UV ergaben die Bildung mehrerer Transformationsprodukte. Dabei traten zwei Verbindungen in größerem Umfang auf, die analog zu den Ergebnissen bei Tetracyclin nach Chlortetracyclin eluierten (Abbildung 12). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde für die Transformationsprodukte 2 und 3 eine dem *seco*-Cyclin A ähnliche Struktur erwartet.

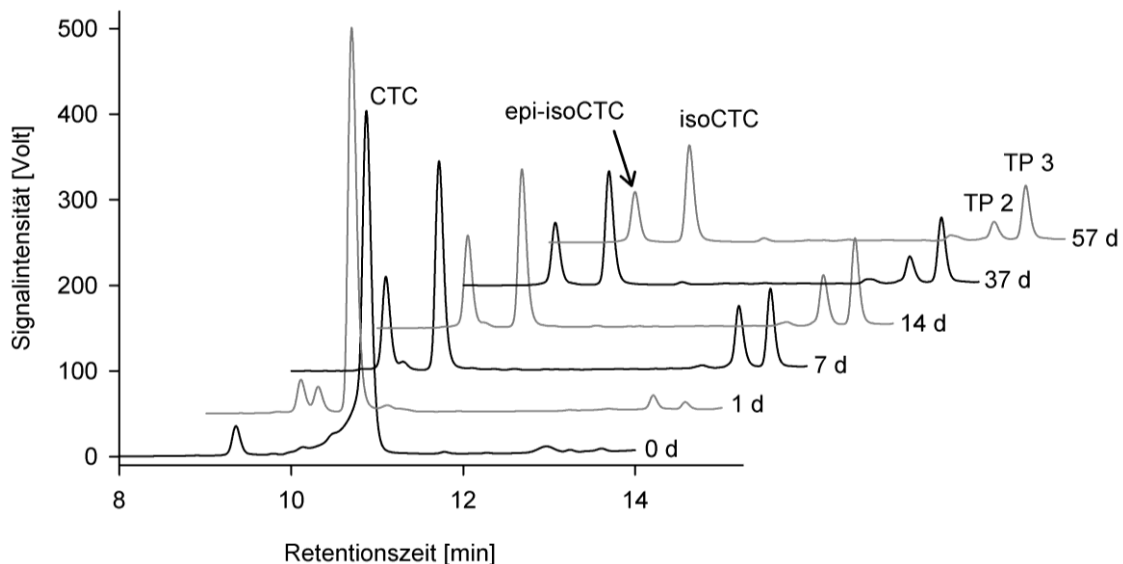


Abbildung 12: HPLC-UV-Chromatogramme der Langzeitinkubation von Chlortetracyclin bei 40 °C in Phosphatpuffer (5 mM, pH 8,0); Detektion erfolgte bei 277 nm; CTC - Chlortetracyclin, (epi-)isoCTC - (4-epi-)iso-Chlortetracyclin, TP - Transformationsprodukt

Für die Isolierung der Transformationsprodukte 2 und 3 wurde Chlortetracyclin für 7 Tage bei 40 °C in 10 mM Phosphatpuffer (pH 8,0) inkubiert. Die Ausgangskonzentration betrug 600 mg L^{-1} in einem Gesamtansatz von 300 mL. Die im Vergleich zu Tetracyclin höhere Ausgangskonzentration war notwendig, da in erster Linie eine Bildung von iso-Chlortetracyclin stattfand und nur ein geringer Teil auf die anderen Produkte entfiel. Die Anreicherung erfolgte mittels SPE. Die Extrakte wurden in drei Schritten mit Hilfe der präparativen HPLC gereinigt. Die Produkte wurden jeweils als tiefrote Flüssigkeiten gewonnen, die nicht in Wasser löslich waren. Für die NMR-Analysen wurden die Transformationsprodukte in D_4 -Methanol unter Zusatz von isotopenmarkierter Ameisensäure gelöst (2% bzw. 4% bei Transformationsprodukt 2 bzw. 3). Die Auswaagen betragen am Ende der Aufreinigung 6,66 mg und 4,13 mg.

Die Messungen mittels hochauflösender Massenspektrometrie ergaben Unterschiede zu den Ergebnissen von Tetracyclin. Für Transformationsprodukt 2 wurde eine Summenformel von $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{ClNO}_{10}$ ermittelt (m/z 466,0533 als $[\text{M}+\text{H}]^+$, -0,6 ppm), was im Vergleich zu Chlortetracyclin einen Verlust von $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$ und einen Zugewinn von zwei Sauerstoffatomen bedeutet. Transformationsprodukt 3 wies sogar eine größere molare Masse als die Ausgangs-

substanz auf. Hier kam es, ausgehend von einer Summenformel von $C_{22}H_{21}ClN_2O_9$ (m/z 493,0988 als $[M+H]^+$, -1,9 ppm), zu einer Abspaltung von zwei Wasserstoffatomen und dem Zugewinn von einem Sauerstoffatom. Im Unterschied zu Tetracyclin konnte folglich mit Transformationsprodukt 3 eine Struktur isoliert werden, die noch die Dimethylaminofunktion enthält.

Die Langzeitinkubation in Phosphatpuffer hatte gezeigt, dass zunächst eine schnelle Isomerisierung des Chlortetracyclins erfolgte und dann die Bildung der Transformationsprodukte in größerem Umfang stattfand (Abbildung 12). Bei den Produkten wurde deswegen eine Struktur vermutet, die sich von iso-Chlortetracyclin ableitet und wie Transformationsprodukt 1 eine Unterbrechung des AB-Ringsystems aufweist. Dies wurde durch NMR-Untersuchungen bestätigt (Abbildung 13). Die Verbindungen wurden bislang nicht in der Literatur beschrieben und wurden somit erstmals im Rahmen dieses Projektes charakterisiert.

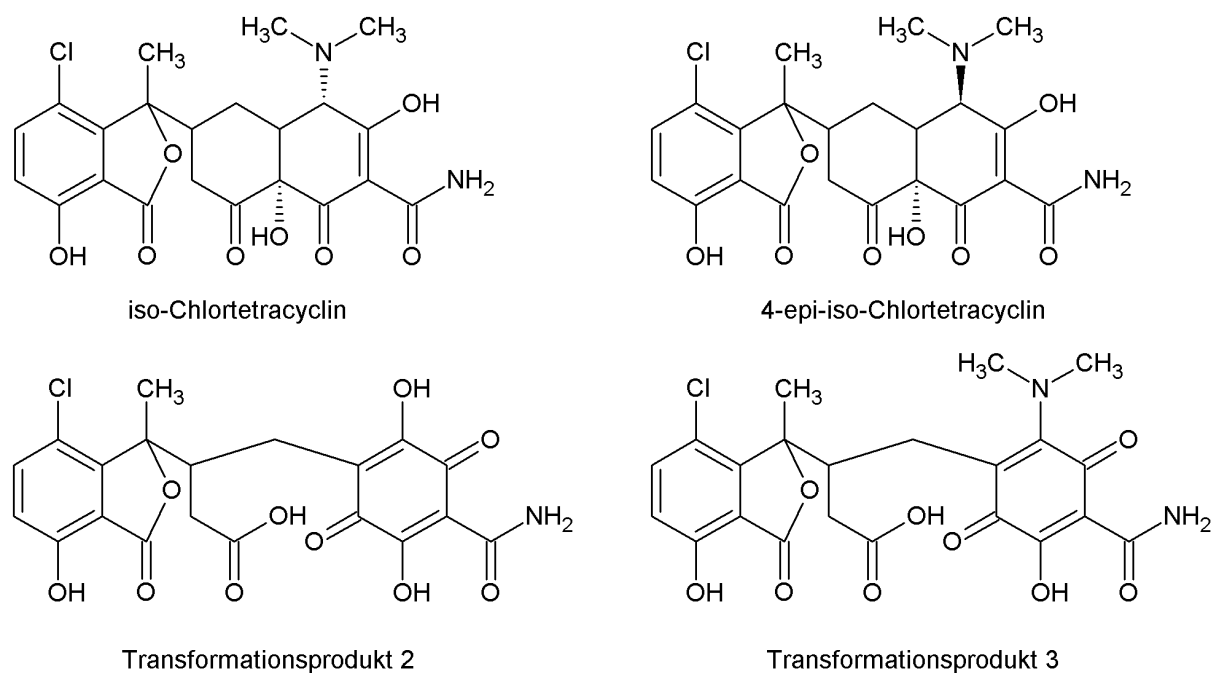


Abbildung 13: Strukturen von iso-Chlortetracyclin und seinem 4-Epimer sowie der neu identifizierten Transformationsprodukte 2 und 3

Die Peaks im HPLC-UV-Chromatogramm zeigten im Laufe der Inkubation eine Abnahme der Intensität (Abbildung 12). Um zu überprüfen, ob leichtflüchtige Verbindungen gebildet wurden oder eine Mineralisierung der Substanzen erfolgte, wurde eine hochkonzentrierte Chlortetracyclin-Lösung (500 mg L^{-1} in 5 mM Phosphatpuffer, pH 8,0) für 24 Tage bei 40°C inkubiert. In regelmäßigen Abständen erfolgte eine Messung des Gesamtkohlenstoffs (total carbon, TC) und des nach Ansäuern nicht austreibbaren organischen Kohlenstoffs (non-purgeable organic carbon, NPOC). Für beide Messserien konnte keine Abnahme der

jeweiligen Gehalte festgestellt werden. Demnach erfolgte eine weitere Veränderung von iso-Chlortetracyclin und der Transformationsprodukte, diese führte aber nicht zu einem vollständigen Abbau der Verbindungen.

Chlortetracyclin, seine iso-Form sowie die Transformationsprodukte 2 und 3 wurden auf ihre Hemmwirkung getestet. Aufgrund des unterbrochenen Ringsystems besitzt iso-Chlortetracyclin im Vergleich zu Chlortetracyclin eine um ca. Faktor 100 minimierte Hemmwirkung [17]. Dies wurde auch in dem durchgeführten Hemmstofftest bestätigt (Abbildung 14). Die neu identifizierten Transformationsprodukte weisen eine weitere Unterbrechung der anellierten Ringe auf, in einem Fall wurde analog zu Transformationsprodukt 1 die Dimethylaminogruppe substituiert. Beide Verbindungen wiesen auch bei einer Konzentration von 500 mg L^{-1} keine Aktivität gegenüber dem Testkeim auf (Abbildung 14).

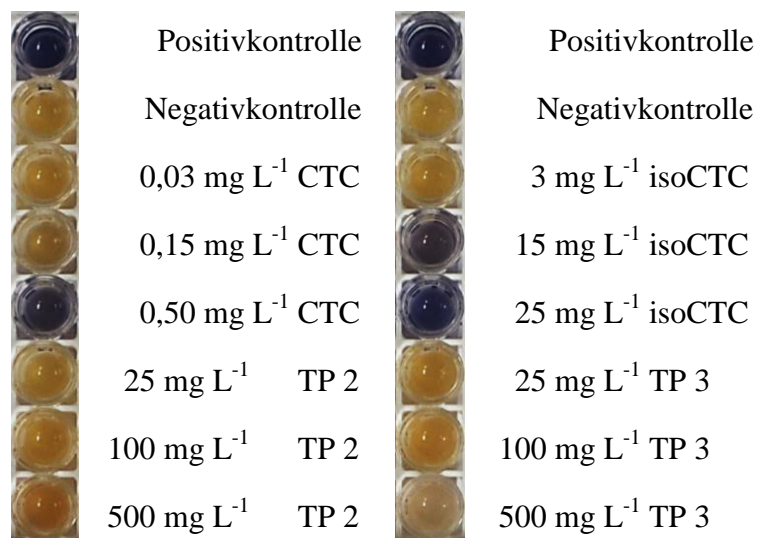


Abbildung 14: Hemmstofftest von Chlortetracyclin (CTC), iso-Chlortetracyclin (isoCTC) und den neu identifizierten Transformationsprodukten (TP 2 und 3)

Die Umlagerung von Chlortetracyclin zu iso-Chlortetracyclin stellt einen irreversiblen Vorgang dar [17]. Deswegen wird, analog zu Transformationsprodukt 1, bei den Transformationsprodukten 2 und 3 von einer irreversiblen Änderung der Molekülstruktur ausgegangen. Im Vergleich zu iso-Chlortetracyclin konnte im untersuchten Konzentrationsbereich keine Hemmwirkung nachgewiesen werden. Damit steht auch in diesem Fall ein Eliminierungsweg zur Verfügung, der im relevanten Konzentrationsbereich zu antibiotisch unwirksamen Produkten führt.

4.3 Nachweis in Fermenterproben

Gülle und Gärreste enthalten Phosphat in der Größenordnung von 1 bis 2 kg pro t (als P_2O_5) [52], was eine Bildung der drei hier beschriebenen Transformationsprodukte in der Matrix ermöglichen könnte. Zur Überprüfung wurden flüssige und feste Rindergülle jeweils mit 20 mg kg^{-1} der Tetracycline dotiert und für 7 Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung und Analyse der Proben (Methode nach [25]). Die Quantifizierung erfolgte anhand von Standards, die aus den isolierten Transformationsprodukten gewonnen wurden. Aufgrund der nicht genau abschätzbaren Reinheit der Isolate, sollten die Angaben als halbquantitativ betrachtet werden.

Tabelle 7: Bildung der Transformationsprodukte in Rindergülle

Matrix	TC	TP 1	CTC	CTC + isoCTC	TP 2	TP 3
Flüssiggülle	7,1	5,1	2,2	8,7	0,19	(0,04)
Festgülle	8,6	3,5	7,4	8,7	(0,05)	n.d.

Angaben in mg kg^{-1} als Mittelwert einer Dreifachbestimmung; TC - Tetracyclin, (iso)CTC - (iso-)Chlortetracyclin, TP - Transformationsprodukt, () - Signal-Rausch-Verhältnis <10 , n.d. - nicht detektiert

Im Fall von Tetracyclin zeigte sich deutlich, dass die Bildung von Transformationsprodukt 1 in den Güllematrices stattfinden kann. In der Flüssiggülle wurden rund 5 mg kg^{-1} detektiert (Tabelle 7). Bei Chlortetracyclin wurde vor allem Transformationsprodukt 2 detektiert. Das Transformationsprodukt 3 wurde in sehr niedriger Konzentration nur in der Flüssiggülle gefunden (Tabelle 7). Die Transformationsprodukte 2 und 3 gehen aus iso-Chlortetracyclin hervor. Da diese Verbindung in der Festgülle nur in einem geringen Umfang gebildet wurde, kam es hier zu einer entsprechend geringeren Bildung der Transformationsprodukte. Vergleicht man die Gehalte der Transformationsprodukte 2 und 3 fällt auf, dass das Produkt ohne die Dimethylaminogruppe in größerem Umfang gebildet wird (TP 2 in Tabelle 7). Eventuell begünstigt die Güllematrix die Abspaltung dieser Gruppe.

Im Hinblick auf dieses Ergebnis wurden einige Proben aus den Fermenter- und Sorptionsstudien auf die Anwesenheit der Transformationsprodukte hin untersucht. Dabei konnte in erster Linie Transformationsprodukt 1 nachgewiesen werden. Transformationsprodukt 2 trat in Spurenkonzentrationen auf, während Transformationsprodukt 3 in der Regel nicht nachgewiesen wurde. Dies entspricht den Ergebnissen aus den Studien der Phosphatpuffer-Inkubationen. Im Fall von Tetracyclin war Transformationsprodukt 1 das Haupttransformationsprodukt (siehe Abbildung 7). Bei Chlortetracyclin konnten mehrere neue Peaks detektiert werden, von denen iso-Chlortetracyclin die Hauptverbindung darstellte (Abbildung 12). Somit entfällt nur ein geringer Anteil auf die Bildung der beiden neu identifizierten Verbindungen. Darüber hinaus konnte bei der Inkubation in Phosphatpuffer

Transformationsprodukt 1 bereits nach 24 Stunden detektiert werden (Maximum nach 42 bis 48 Stunden). Bei den Transformationsprodukten 2 und 3 von Chlortetracyclin konnten nach 24 Stunden Spuren detektiert werden, das Maximum der Peakintensität wurde erst nach 7 Tagen erreicht (Abbildung 12).

Inwiefern diese in Phosphatpuffer-Lösungen beobachteten Kinetiken auf Gülleproben übertragen werden können, ist nicht geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass die Reaktionen aufgrund der zweiwertigen Kationen in der Matrix langsamer und in einem geringeren Umfang ablaufen (siehe Kapitel 4.1.1). Hierfür spricht, dass die in den Fermenterproben detektierten Gehalte von Transformationsprodukt 1 unterhalb von $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ lagen (Gehalt von Tetracyclin bis zu $3,3 \text{ mg kg}^{-1}$, Abbildung 4 E). Es ist außerdem denkbar, dass bei Transformationsprodukt 1 aufgrund seiner Struktur (Aufbrechen des anellierten Ringsystems) eine weitere (a)biotische Transformation stattfindet. Um dies zu überprüfen, wurden für diese Substanz Stabilitätsuntersuchungen in Phosphatpufferlösung und Fermentermatrix vorgenommen. Bei Letzterer wurde jeweils 1 g Matrix mit Transformationsprodukt 1 dotiert (finaler Gehalt 3 mg kg^{-1}) und für 4 bis 14 Tage bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Analyse ergab einen Rückgang des Gehaltes um 40% innerhalb von zwei Wochen. Die Verbindung wird folglich in Fermenterproben weiter eliminiert. Im Hinblick auf die Fermenterstudien muss außerdem beachtet werden, dass es sich dabei um ein semi-kontinuierliches System gehandelt hat, wohingegen der Stabilitätstest als batch-Ansatz durchgeführt wurde. Das Versuchsdesign könnte dazu beigetragen haben, dass Transformationsprodukt 1 in den Fermenterstudien in größerem Umfang eliminiert wurde. In den Phosphatpufferproben (pH 8,0, Inkubation bei $55 \text{ }^\circ\text{C}$) zeigte sich ein Rückgang der Produktkonzentration um 50% innerhalb von 3 Tagen. Auch Transformationsprodukt 1 scheint somit in der Güllematrix stabilisiert zu werden, da die Eliminierung in dem Fall langsamer ablief.

Basierend auf den Daten für die Gülle- und Fermenterproben scheint der Beitrag der Transformationsprodukte zu der Eliminierung der Ausgangssubstanzen gering zu sein. Wie für Transformationsprodukt 1 gezeigt, findet jedoch eine weitere Eliminierung statt, so dass von keiner größeren Akkumulation der Verbindungen im Fermenter auszugehen ist. Die Transformationsreaktionen hängen außerdem von verschiedenen Faktoren ab (Temperatur, Anwesenheit von Phosphat und zweiwertigen Kationen, Inkubationszeit). Deswegen kann der wahre Umfang der Bildung der Transformationsprodukte nach derzeitigem Kenntnisstand nicht abgeschätzt werden.

5 Sorptionsstudien

5.1 Sorption in wässriger Lösung

Die Ergebnisse der semi-kontinuierlichen Fermenterstudien (Kapitel 3.3) legten nahe, dass Sorption ein relevanter Eliminierungsweg für die untersuchten Antibiotika darstellt. Aus diesem Grund wurden verschiedene Sorptionsstudien durchgeführt, um den Einfluss von Feststoffen auf die Eliminierung zu analysieren.

Um den Umfang einer potentiellen Sorption auf die Eliminierung abschätzen zu können, wurden in einem ersten Versuch Sulfadiazin, Sulfamethazin, Tetracyclin und Chlortetracyclin bei 40 °C in Hydrogencarbonatpuffer (50 mM, pH 7,4) ohne und mit Zusatz von 15% Maissilage inkubiert. Über 24 Stunden hinweg wurde in einem Intervall von 2 Stunden eine Probe aufgearbeitet und analysiert. Die Messung der ersten Probe erfolgte davon abweichend nach 30 Minuten. Für die Gehalte wurden analog zu den Fermenterstudien 5 mg kg⁻¹ für die Sulfonamide und 10 mg kg⁻¹ für die Tetracycline gewählt.

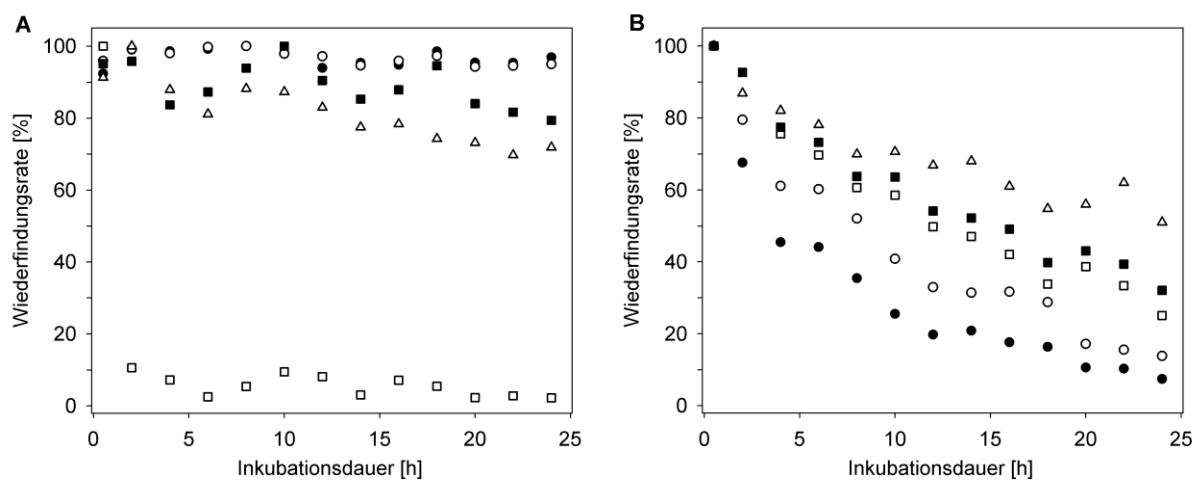


Abbildung 15: Wiederfindungsraten von Sulfadiazin (○), Sulfamethazin (●), Tetracyclin (Δ), Chlortetracyclin (□) und der Summe von (iso-)Chlortetracyclin (■) nach Inkubation in Hydrogencarbonatpuffer (A) ohne und (B) mit Zusatz von Maissilage; Daten sind das Ergebnis einer Einfachbestimmung

Bei der Inkubation ohne Maissilage wurde innerhalb der ersten halben Stunde für alle Verbindungen eine Wiederfindungsrate >90% ermittelt (Abbildung 15 A). Innerhalb der ersten zwei Stunden erfolgte ein Rückgang des Chlortetracyclin-Gehalts auf weniger als 11% des Ausgangswertes. Dies ging auf die Bildung von iso-Chlortetracyclin zurück, die aufgrund des vorliegenden pH-Wertes gefördert wurde (Abbildung 15 A) [17]. Tetracyclin sowie die Summe von (iso-)Chlortetracyclin erfuhren innerhalb von 24 Stunden einen Rückgang um 28% bzw. 21%, während bei den Sulfonamiden keine Abnahme verzeichnet wurde. Dies entspricht den Ergebnissen der Inkubation ohne Pufferzusatz (Kapitel 2.2, Abbildung 3).

Der Zusatz von Maissilage führte zu einer Abnahme des pH-Wertes (6,2). Dadurch kam es zu einer verringerten Bildung von iso-Chlortetracyclin. Nach 24 Stunden betrug die Abnahme knapp 50% im Fall von Tetracyclin und 75% bzw. 68% im Fall von Chlortetracyclin und der Summe von (iso-)Chlortetracyclin (Abbildung 15 B). Der erhöhte Rückgang der Konzentration im Vergleich zu dem Ansatz ohne Maissilage spricht für eine (zusätzliche) Eliminierung durch Sorptionsprozesse. Darüber hinaus könnte durch den Maiszusatz eine verstärkte Bildung der Transformationsprodukte (Kapitel 4) stattgefunden haben. Zu dem Zeitpunkt der Studie waren die Strukturen der Verbindungen noch nicht bekannt, so dass keine Analyse dieser erfolgte.

Die Sulfonamide zeigten in dem Ansatz mit Maissilage eine größere Eliminierung als die Tetracycline. Bereits nach 4 Stunden waren nur noch 61% Sulfadiazin und 45% Sulfamethazin nachweisbar. Am Ende der Inkubation gingen die Anteile auf 16% bzw. 7% zurück (Abbildung 15 B). Sulfamethazin zeigte damit analog zu den Fermenterstudien eine höhere Eliminierung als Sulfadiazin (vergleiche Tabelle 4, Kapitel 3.3.1). Da die Sulfonamide in den anderen *in vitro* Studien eine höhere Stabilität als die Tetracycline aufwiesen und selbst nach zehntägiger Inkubation in Reinstwasser keine Abnahme der Konzentration zeigten (Kapitel 2.2), werden Sorptionsprozesse als Grund für die Eliminierung angesehen.

Tetracycline können verschiedenen Reaktionen wie einer Isomerisierung, Epimerisierung oder der gezeigten Bildung von Transformationsprodukten unterliegen, die zu einer Eliminierung führen können. Sorption ist damit nur ein möglicher Eliminierungsweg. Aus diesem Grund wurden die Studien zu den Mechanismen der Sorptionsprozesse lediglich anhand der Sulfonamide durchgeführt. Basierend auf den Ergebnissen der anderen Studien wird davon ausgegangen, dass die Eliminierung von Sulfadiazin und Sulfamethazin nahezu ausschließlich auf Sorption zurückgeht.

5.2 Sorption von Sulfonamiden

5.2.1 Sorption in Gülle und Fermentermatrix

Die Versuche wurden anhand von Rindergülle und dem Fermenterrückstand der Biogasanlage am LHL in Bad Hersfeld durchgeführt. Die Matrices wurden vor der Verwendung zentrifugiert (5 min, 1600 g) und die flüssige und feste Phase separiert. Die feste Phase wird im weiteren Verlauf als „matraxeigener Feststoff“ bezeichnet. Der flüssigen Phase wurden verschiedene Feststoffe mit unterschiedlichen Anteilen zugesetzt. Dabei handelte es sich um den matraxeigenen Feststoff sowie um Maissilage, die entweder direkt eingesetzt wurde („Mais grob“) oder nach vorheriger Zerkleinerung mit Hilfe einer elektrischen Kaffeemühle („Mais klein“). Die Ansatzgröße betrug 1 g mit Feststoffanteilen von 2,5% bis 15,0%. Die

Inkubation erfolgte für 24 Stunden bei 40 °C und 55 °C, der Gehalt der Sulfonamide betrug 5 mg kg⁻¹. Im Anschluss an die Inkubation wurde der Ansatz als Ganzes aufgearbeitet [25], eine Unterscheidung zwischen flüssiger und fester Phase erfolgte nicht. Die Ansätze erfolgten jeweils als Dreifachbestimmung.

Tabelle 8: Eliminierungsraten der Sulfonamide in Abhängigkeit des Feststoffanteils und der Feststoffart in Fermentermatrix bei verschiedenen Temperaturen

T [°C]	Art des Feststoffs	Feststoffanteil [%]					
		2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0
SDZ							
40	---	10	9	9	6	6	8
	matriceigen	10	9	10	9	12	8
	Mais grob	14	16	24	28	49	52
	Mais klein	15	23	27	35	57	63
55	---	5	7	2	4	5	5
	matriceigen	5	7	2	6	10	9
	Mais grob	7	11	11	17	24	25
	Mais klein	9	13	12	18	26	29
SMZ							
40	---	14	12	14	10	11	12
	matriceigen	14	13	15	15	18	13
	Mais grob	20	24	39	43	67	64
	Mais klein	22	34	41	52	73	75
55	---	6	10	4	9	9	7
	matriceigen	7	9	4	13	17	12
	Mais grob	10	19	24	40	44	46
	Mais klein	12	25	24	39	48	51

Angaben in % als Mittelwert einer Dreifachbestimmung; Proben ohne Feststoffzusatz wurden bei jedem untersuchten Feststoffanteil als Kontrolle mitgeführt; SDZ - Sulfadiazin, SMZ - Sulfamethazin

Da sich die Durchführungen der einzelnen Inkubationsversuche über mehrere Tage erstreckten, wurde an jedem Versuchstag eine Dreifachbestimmung der Flüssigphase ohne Feststoffzusatz mitgeführt (Tabelle 8). Dies diente zur Kontrolle der Dotierung und Probenvorbereitung. Die relative Standardabweichung für die Proben der Flüssigphase betrug weniger als 5% und es traten lediglich geringfügige Unterschiede auf. Die Ergebnisse der anderen Ansätze gehen somit nicht auf methodenbedingte Schwankungen zurück, sondern zeigen einen Einfluss der zugesetzten Feststoffe auf die Eliminierung der zwei untersuchten Sulfonamide. Die zwei untersuchten Matrices zeigten einen ähnlichen Verlauf der Eliminierungsraten in Abhängigkeit der untersuchten Parameter. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden deswegen nur die Ergebnisse für die Fermentermatrix aufgeführt (Tabelle 8).

Die Eliminierungsraten in der Flüssigmatrix lagen zwischen 6 und 14%, wobei Sulfamethazin erneut höhere Werte zeigte (Tabelle 8). Dies wird, wie bei den Fermenterstudien bereits ausgeführt, auf die unterschiedlichen pKs-Werte der zwei Verbindungen zurückgeführt. Der höhere Anteil neutraler Moleküle im Fall von Sulfamethazin begünstigt die Sorption im Vergleich zu Sulfadiazin (Kapitel 3.3.1) [39,42]. Die geringen Eliminierungsraten zeigen, dass die zwei untersuchten Sulfonamide in der Fermentermatrix über den Beobachtungszeitraum von 24 Stunden stabil sind. Die beobachtete geringe Eliminierung wird auf die in der Matrix enthaltenen Feinpartikel zurückgeführt, die nicht durch Zentrifugieren entfernt werden konnten. Studien mit Bodenproben haben gezeigt, dass mit kleineren Partikelgrößen höhere Adsorptionskoeffizienten (nach Freundlich) erzielt werden konnten [8]. Somit tragen auch diese Partikel zu einer Eliminierung bei.

Bei dem matrixeigenen Feststoff handelte es sich um Partikel, die bereits längere Zeit mit der Flüssigphase interagieren konnten. Die Oberfläche unterschied sich demnach von der der frischen Maissilage. Diese Unterschiede spiegelten sich in den jeweiligen Eliminierungsraten wider. Die Ergebnisse waren trotz des Zusatzes von bis zu 15% matrixeigenem Feststoff mit denen der Inkubation in der Flüssigphase vergleichbar (Tabelle 8, Tabelle 9). Die hier erhaltenen Ergebnisse können die Daten aus anderen Fermenterstudien erklären. Spielmeyer *et al.* führten semi-kontinuierliche Versuche mit zwei Matrices durch, die sich in ihrem Trockensubstanz-Gehalt unterschieden. Trotz des Unterschiedes wurden im Fall von Sulfamethazin ähnliche Eliminierungsraten erhalten, bei Sulfadiazin wurde bei der Studie mit höherem Trockensubstanz-Gehalt eine geringere Eliminierung ermittelt [59]. Die Trockensubstanz stammte aus der eingesetzten Gülle- und Inokulummatrix. Dabei handelt es sich um Material, das schon länger in der Matrix inkubiert wurde. Gemäß der Ergebnisse der Sorptionsstudie fördert dieses Material keine Sorption der Sulfonamide und damit findet keine verstärkte Eliminierung statt. Die in den Fermenterstudien ([59], Kapitel 3) beobachtete Eliminierung geht demnach auf die täglich zugesetzte frische Maissilage zurück.

Diese Annahme wird durch die Sorptionsversuche bestätigt. Im Unterschied zu dem matrixeigenen Feststoff erhöhte der Zusatz von Maissilage die Eliminierungsrate deutlich. Die Rate stieg mit zunehmendem Maisanteil stetig an (Tabelle 8). Darüber hinaus spielt die Größe der Oberfläche eine Rolle. Die zerkleinerte Maissilage lieferte im Vergleich zu der groben Maissilage zum Teil höhere Eliminierungsraten (Tabelle 8, Tabelle 9). Dies bestätigt die Ergebnisse von Sorptionsstudien mit Bodenpartikeln, wonach kleinere Partikel zu größeren Freundlich-Adsorptionskoeffizienten führen [8]. Die Eliminierung hängt demnach nicht von der Anwesenheit des Feststoffes *per se* ab, sondern wird auch von dessen Oberflächenbeschaffenheit beeinflusst. In Kompostmatrix wurden zum Beispiel für Sulfathiazol höhere Sorptionskoeffizienten ermittelt als in Gülle [60]. Bei höheren Feststoffanteilen in der Gülle sind gegebenenfalls härtere Extraktionsbedingungen notwendig, um die Analyten von der Matrix zu lösen [61]. Auch bei der Sorption im Boden spielt der Anteil der organischen

Substanz eine Rolle. Werden Sulfonamide mit Gülle auf den Boden ausgebracht, zeigen sie eine stärkere Sorption im Oberboden [62,63].

Tabelle 9: Statistischer Vergleich der Eliminierungsraten der Sulfonamide bei verschiedenen Feststoffanteilen in Abhängigkeit von der Art des Feststoffes, der Inkubationstemperatur und der Matrix

Unterschied zwischen	Feststoffanteil [%]					
	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0
SDZ						
flüssig : matriceigen	nein	nein	nein	nein	nein	nein
flüssig : Mais klein	ja	ja	ja	ja	ja	ja
flüssig : Mais grob	nein	ja	ja	ja	ja	ja
matriceigen : Mais klein	ja	ja	ja	ja	ja	ja
matriceigen : Mais grob	nein	ja	ja	ja	ja	ja
Mais grob : Mais klein	nein	ja	nein	nein	nein	ja
40 °C : 55 °C	ja	ja*	ja	ja*	ja	ja
SMZ						
flüssig : matriceigen	nein	nein	nein	ja	ja	ja
flüssig : Mais klein	ja	ja	ja	ja	ja	ja
flüssig : Mais grob	ja	ja	ja	ja	ja	ja
matriceigen : Mais klein	ja	ja	ja	ja	ja	ja
matriceigen : Mais grob	nein	ja	ja	ja	ja	ja
Mais grob : Mais klein	ja	ja	nein	nein	nein	ja
40 °C : 55 °C	ja	nein ⁺	ja	ja	nein ⁺	ja

Statistischer Vergleich anhand einer Three Way ANOVA mit Tukey Post-Hoc-Test, signifikanter Unterschied für $p < 0,01$; * kein Unterschied bei flüssig und matriceigen, ⁺ Unterschied bei Mais fein; SDZ - Sulfadiazin, SMZ - Sulfamethazin

Analog zu den Fermenterstudien führte eine Temperaturerhöhung von 40 °C auf 55 °C zu einer geringeren Eliminierung, die in den meisten Fällen signifikant niedriger war (Tabelle 9). Dadurch werden die bei den Fermenterstudien getroffenen Rückschlüsse unterstützt, dass die Eliminierung in erster Linie durch Sorption erfolgt und dieser exotherme Prozess durch die erhöhte Temperatur in einem geringeren Umfang stattfindet (siehe Kapitel 3.3.1).

5.2.2 Einfluss von Zeit und Temperatur

Um die Kinetik der Sorption von Sulfonamiden in Gülle- und Fermentermatrix zu untersuchen, wurden weitere Versuche mit verschiedenen Inkubationszeiten (12/24/48 Stunden) sowie unterschiedlichen Inkubationstemperaturen vorgenommen (4/21,5/40/55 °C).

Tabelle 10: Eliminierungsraten der Sulfonamide in den Matrices Fermenter und Rindergülle in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Matrix	Art des Feststoffs	SDZ			SMZ		
		Inkubationsdauer [h]			Inkubationsdauer [h]		
		12	24	48	12	24	48
Fermenter	---	7	6	10	9	11	14
	matraxeigen	9	12	13	14	18	19
	Mais grob	25	49	52	38	67	69
	Mais klein	29	57	59	46	73	76
Rindergülle	---	8	11	10	13	18	17
	matraxeigen	14	21	21	23	34	36
	Mais grob	44	58	66	53	67	76
	Mais klein	47	60	71	57	70	80

Angaben in % als Mittelwert einer Dreifachbestimmung; die Inkubation erfolgt bei 40 °C mit einem Feststoffanteil von 12,5%; SDZ - Sulfadiazin, SMZ - Sulfamethazin

Mit längerer Inkubationszeit nahm die Eliminierungsrate für beide Matrices zu. Dieser Trend war unabhängig von dem verwendeten Feststoff (Tabelle 10). Der zeitliche Verlauf lässt erkennen, dass der überwiegende Teil der Sorptionsvorgänge innerhalb der ersten 24 Stunden stattfand. Im Zeitraum von 24 bis 48 Stunden stieg die Eliminierungsrate in den meisten Fällen nur noch geringfügig an. Eine Ausnahme bildet die feine Maissilage in der Matrix Rindergülle (Tabelle 10). Rindergülle und Fermentermatrix zeigten auch in diesem Versuch die gleichen Tendenzen mit vergleichbaren Eliminierungsraten nach 48 Stunden.

Der zeitliche Verlauf geht mit den Ergebnisse der Inkubation in Hydrogencarbonatpuffer mit Maissilagezusatz einher (Kapitel 5.1). Dort fand innerhalb der ersten 12 Stunden der Großteil der Eliminierung statt. Im weiteren Verlauf war zwar eine weitere Abnahme der Analytkonzentration zu verzeichnen, diese fiel aber geringer aus (Abbildung 15 B). Der Vergleich zeigt andererseits, dass die Sorptionsprozesse in der komplexeren Matrix langsamer und im betrachteten Zeitraum in einem geringeren Umfang ablaufen. Die Sorption eines Moleküls an/in einem Material setzt eine Interaktion der Verbindung mit dem Sorbens voraus. Hierfür ist eine Diffusion des Moleküls an die Oberfläche notwendig. Eine verringerte Eliminierung der Sulfonamide kann somit auf eine langsamere Diffusion zurückgehen. Ein

Grund für eine verlangsamte Diffusion kann die höhere Viskosität der Fermentermatrix im Vergleich zu Reinstwasser darstellen.

In organischen Matrices beanspruchen sowohl Sorptions- als auch Desorptionsvorgänge eine längere Zeit, zum Beispiel aufgrund der langsamen Diffusion in Poren oder durch eine potentielle Ausbildung kovalenter Bindungen [60,64]. Vor diesem Hintergrund kann nicht von einem Abschluss der Sorptionsprozesse nach 24 Stunden ausgegangen werden. Dies zeigen auch Studien, die eine langfristige Inkubation von Sulfonamiden in Matrices wie Boden, Gülle oder Kompost untersuchten. Auch in diesen Studien fand innerhalb der ersten 24 Stunden eine schnelle Sorption statt. Allerdings konnte auch nach sieben oder 14 Tagen ein weiterer Anstieg der Eliminierungsrate festgestellt werden [60,65]. Antibiotika können in Gülle oder im Boden über einen längeren Zeitraum hinweg mit der Matrix interagieren. Dies kann zu einem deutlich größeren Umfang der Sorptionsprozesse führen als in diesem Experiment dargestellt. Dafür sprechen die vergleichsweise niedrigen Wiederfindungsraten von Sulfonamiden in gealterten Bodenproben [66]. Die geringen Unterschiede zwischen den Proben nach 24 und 48 Stunden sprechen auch dafür, dass ein täglicher Maissilage-Zusatz in semi-kontinuierlichen Fermenterstudien zu einer höheren Eliminierung führt als eine einmalige Zufuhr (vergleiche Kapitel 3.3.1, [40,41,59]).

Tabelle 11: Eliminierungsraten der Sulfonamide in der Fermentermatrix in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur

Matrix	Art des Feststoffs	Feststoffanteil 5,0%				Feststoffanteil 12,5%			
		Inkubationstemperatur [°C]				Inkubationstemperatur [°C]			
		4	21,5	40	55	4	21,5	40	55
SDZ									
Fermenter	---	11	10	9	7	12	9	6	5
	matraxeigen	11	11	9	7	12	10	12	10
	Mais grob	16	21	16	11	25	40	49	24
	Mais klein	15	21	23	13	22	39	57	26
SMZ									
Fermenter	---	18	13	12	10	17	14	11	9
	matraxeigen	18	15	13	9	18	15	18	17
	Mais grob	25	28	24	19	34	53	67	44
	Mais klein	25	32	34	25	32	54	73	48

Angaben in % als Mittelwert einer Dreifachbestimmung; SDZ - Sulfadiazin, SMZ - Sulfamethazin

Die Inkubation bei verschiedenen Temperaturen wurde für zwei verschiedene Feststoffanteile durchgeführt (5% und 12,5%). Die Flüssigproben sowie die Proben mit Zusatz von matrix-eigenem Feststoff zeigten nur einen geringen Einfluss der Temperatur mit meist niedrigeren

Eliminierungsraten bei steigender Temperatur (Tabelle 11). Bei einem Zusatz von Maissilage wurden höhere Eliminierungsraten erreicht. Für einen Feststoffanteil von 5,0% traten analog zu den Flüssigproben und den Proben mit matrixeigenem Feststoff nur geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen Temperaturen auf (maximal zehn Prozentpunkte, Tabelle 11). Tendenziell war die niedrigste Eliminierung bei 55 °C zu beobachten. Dies spricht, wie bereits ausgeführt (Kapitel 3.3), für eine Eliminierung durch Sorption.

Auch bei einem Feststoffzusatz von 12,5% traten bei 55 °C niedrigere Eliminierungsraten auf als bei 21,5 und 40 °C. Hier fielen die Unterschiede mit bis zu 26 Prozentpunkten zwischen den Ansätzen allerdings größer aus. In den meisten Fällen wurde die höchste Eliminierung bei 40 °C erhalten, während die niedrigsten Werte bei 4 °C zu beobachten waren (Tabelle 11). Letzteres unterstützt ebenfalls den Rückschluss, dass Sorption der relevante Eliminierungsweg für Sulfonamide in der Matrix ist. Die Geschwindigkeit der Moleküldiffusion hängt von der Viskosität und der Temperatur des Mediums ab. Eine hohe Viskosität und/oder eine niedrige Temperatur führen zu einer geringeren Diffusion der Moleküle (Temperaturabhängigkeit der Brownschen Bewegung). Da die Diffusion einen relevanten Prozess im Zusammenhang mit der Sorption darstellt [60,64], erfolgte bei der Inkubation bei 4 °C eine etwas geringere Eliminierung als bei den anderen Temperaturen (Tabelle 11). Im Hinblick auf das Zeitexperiment ist davon auszugehen, dass eine längere Inkubation auch bei 4 °C zu einem Anstieg der Eliminierungsraten geführt hätte.

5.2.3 Einfluss einer Behandlung der Maissilage

In den semi-kontinuierlichen Fermenterstudien wurden bei Einsatz von Hydrolysat niedrigere Eliminierungsraten beobachtet als bei Einsatz von Maissilage (Tabelle 4). Als Ursache hierfür wird eine Veränderung der Oberfläche der Maissilage vermutet. Diese Änderung(en) führen zu einer verringerten Sorption der Sulfonamide und damit zu einer niedrigeren Eliminierung (vergleiche Kapitel 3.3.1). Um diese Annahme zu überprüfen, wurde Maissilage unterschiedlichen Behandlungen unterzogen und anschließend in einem Sorptionsversuch eingesetzt.

Für die Behandlung wurde die Silage zum einen für 7 Tage bei 4 °C in Fermentermatrix inkubiert (2,5 g auf 20 mL). Dies stellte eine Simulation des matrixeigenen Feststoffs dar. Zum anderen wurde die Silage für 7 Tage in Salzsäure (pH 4,5) gelagert. Dies diente der Simulation einer Fermentermatrix-freien sauren Hydrolyse. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert und der feste Rückstand viermal mit Reinstwasser gewaschen, um Rückstände der Inkubationslösung zu entfernen. Der Feststoff wurde für 2 Stunden an der Luft getrocknet und dann im Versuch mit einem Anteil von 12,5% eingesetzt. Parallel wurde eine Inkubation mit unbehandelter Maissilage durchgeführt.

Beide Behandlungsvarianten führten zu einer deutlichen Abnahme der Eliminierungsraten (Tabelle 12). Im Fall der Behandlung mit der Fermentermatrix bestätigt dies die Ergebnisse und Diskussion der vorangegangenen Sorptionsstudien („matrizeigener Feststoff“, vergleiche Kapitel 5.2.1 und 5.2.2). Die Inkubation in Salzsäure führte zu vergleichbaren Ergebnissen wie die Inkubation in der Fermentermatrix, in einigen Fällen kam es zu einer weiteren Abnahme der Eliminierungsrate (Tabelle 12). Dies unterstützt die für die semi-kontinuierlichen Fermenterstudien getroffenen Rückschlüsse. Die saure Hydrolyse führt zu einer Veränderung der Struktur der Maissilage, die wiederum Auswirkungen auf die Sorption der Sulfonamide hat. Aufgrund der verringerten Sorption wurde eine niedrigere Eliminierungsrate ermittelt (Tabelle 4).

Tabelle 12: Eliminierungsraten der Sulfonamide in Abhängigkeit von der Behandlung der Maissilage

Temperatur [°C]	Art des Feststoffs	Maisbehandlung		
		unbehandelt	Fermenter*	säurebehandelt ⁺
SDZ				
40	Mais grob	36	24	21
	Mais klein	48	27	19
55	Mais grob	24	12	14
	Mais klein	30	13	11
SMZ				
40	Mais grob	57	38	35
	Mais klein	68	44	32
55	Mais grob	38	26	29
	Mais klein	58	28	22

Angaben in % als Mittelwert einer Dreifachbestimmung; * - die Maissilage wurde sieben Tage in Fermentermatrix inkubiert; + - die Maissilage wurde für sieben Tage in Salzsäure (pH 4,5) inkubiert; der Feststoffanteil betrug jeweils 12,5%; SDZ - Sulfadiazin, SMZ - Sulfamethazin

Im Hinblick auf die Eliminierungsraten traten in den Fermenterstudien unter thermophilen Bedingungen keine Unterschiede zwischen dem Zusatz von Maissilage und Hydrolysat auf (Tabelle 4). Dieses Ergebnis konnte in diesem Versuch nicht bestätigt werden. Auch bei der Inkubation bei 55 °C lieferte die behandelte Maissilage niedrigere Werte als der unbehandelte Feststoff (Tabelle 12). Für alle Ansätze war jedoch ein Rückgang der Eliminierungsrate bei der höheren Temperatur zu beobachten. Ein Grund für den Unterschied zwischen den Fermenterstudien und dem Versuch hier könnte der vergleichsweise hohe Feststoffanteil in der Probe sein. In den Fermentern nahm die Maissilage im Hydrolysat bezogen auf die Gesamtmenge im Reaktor einen geringeren Anteil ein (110 g auf 15 kg, entspricht 0,73%). Wie bei der Studie mit unterschiedlichen Maisanteilen gezeigt, hat die Feststoffmenge einen Einfluss auf die Eliminierungsrate (Tabelle 8).

5.2.4 Relevante Strukturen für die Sorption

Die Studien mit der Inkubation von Fermentermatrix, Maissilage und Sulfonamiden haben ergeben, dass Sorption als der wichtigste Eliminierungsweg für diese Substanzen angesehen werden kann. Darauf aufbauend wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, um relevante Strukturbestandteile zu ermitteln. Hierfür wurden Standardsubstanzen mit unterschiedlichen Strukturmerkmalen in Wasser gelöst bzw. suspendiert und mit einem Gehalt von 10 g kg⁻¹ zu 125 mg Kieselgel als Trägermatrix gegeben. Kieselgel selbst zeigte keinen Einfluss auf die Eliminierung von Sulfadiazin und Sulfamethazin (Tabelle 13). Außerdem wurde in einem anderen Ansatz jede Standardsubstanz ohne Kieselgelmatrix mit einem Gesamtgehalt von 125 g kg⁻¹ eingesetzt. In beiden Fällen wurden die Sulfonamide mit einem Gehalt von 5 mg kg⁻¹ zugefügt und der Ansatz jeweils auf 1,00 g mit Reinstwasser aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden bei 40 °C.

Nur bei wenigen Substanzen konnte eine Eliminierung der Sulfonamide festgestellt werden. Bei den Ansätzen mit 10 g kg⁻¹ konnte lediglich für Lignin und den Huminsäuren-Standard ein Rückgang des Sulfonamid-Gehaltes beobachtet werden (Tabelle 13). Bei einem Substanzgehalt von 125 mg g⁻¹ trat zusätzlich bei Oxalsäure, Glucose sowie Sorbinsäure und Pektin eine Eliminierung auf. Im Fall von Oxalsäure und Glucose konnte jeweils ein Konjugationsprodukt nachgewiesen werden. Das Addukt wird durch eine Wasserabspaltung über die NH₂-Gruppe des Sulfonamids ausgebildet [67-69]. Für die Ansätze mit Sorbinsäure und Pektin wurde dies nicht weiter untersucht, da hier aufgrund der Carbonsäurefunktion analoge Reaktionen erwartet wurden. Derartige Konjugationsreaktionen sind potentiell reversibel, so dass durch eine Hydrolyse des Produktes die aktive Verbindung wieder freigesetzt werden kann [69]. Da die Addukte nur bei den erhöhten Konzentrationen auftraten, wurden die betreffenden Ausgangssubstanzen nicht weiter untersucht.

Huminsäuren gehören zusammen mit Fulvosäuren und Huminen zu der Substanzklasse der Huminstoffe. Sie entstehen zum Beispiel durch den Abbau von Lignin und Cellulose aus abgestorbenen Pflanzenresten oder auch bei der Umsetzung von Polysacchariden, Proteinen sowie Triglyceriden aus Tierkadavern [70]. Die dabei gebildeten hochmolekularen Verbindungen weisen keine einheitliche Struktur auf. Die Struktur hängt nicht nur von den Ausgangsmaterialien, sondern auch von den biologischen Verhältnissen des Bodens oder dem Klima ab. Strukturelle Elemente wie (aromatische) Ringe, Hydroxyl-, Amino- oder Carboxylgruppen sowie hydrophobe Seitenketten sind charakteristisch für die Huminstoffe [70]. Sie verfügen damit über eine Vielzahl von möglichen Sorptionsstellen, die zu einer Eliminierung der Sulfonamide beitragen können.

Tabelle 13: Eliminierungsraten der Sulfonamide in Abhängigkeit von der Anwesenheit verschiedener Strukturelemente in Lösungen bzw. Suspensionen

Verbindung	(zusätzliches) Strukturelement	10 g kg ⁻¹		125 g kg ⁻¹	
		SDZ	SMZ	SDZ	SMZ
Kieselgel	SiOH			6	4
Oxalsäure	COOH	7	5	23	21
Glucose	OH	8	6	41	40
Glycin	NH	2	2	1	0
Cystein	SH	-1	0	1	-1
Benzoessäure*	Benzolring	-1	1	0	0
Natriumhydrogenphosphat	PO ₄ ³⁻	3	3	2	1
Sorbinsäure**	konjugierte Doppelbindung	1	1	74	85
Pektin	D-Galacturonsäure (α-1,4)	1	2	17	18
Cellulose	D-Glucose (β-1,4)	-2	1	-1	0
Stärke	D-Glucose (α-1,4)	-1	-1	-1	0
Lignin	u.a. Sinapyl-, Coniferyl-, Cumarylalkohol	51	82	79	86
Rinderserum Albumin	Peptidbindung + fkt. Gruppen der Aminosäuren	0	-1	3	4
Keimöl	Triglyceride	1	3	-2	-1
Huminsäuren	zahlreiche funktionelle Gruppen	23	42	68	75

Angaben in % als Mittelwert einer Dreifachbestimmung; * - gelöst in Methanol-Wasser (1:1, v/v); ** - gelöst unter Zugabe von 1 M Natronlauge; Ansätze mit 10 g kg⁻¹ enthielten zusätzlich 125 mg Kieselgel; SDZ - Sulfadiazin, SMZ - Sulfamethazin

Für die Eliminierung können die chemische Struktur und/oder die Anwesenheit des Huminsäuren-Feststoffs relevant sein. Um dies zu überprüfen, wurden die Sulfonamide jeweils in einer Huminsäuren-Lösung (gelöst durch Zusatz von 1 M Natronlauge) und in einer Huminsäuren-Suspension in Reinstwasser ohne Kieselgel inkubiert. Dabei wurden unterschiedliche Gehalte der Huminsäuren getestet (Tabelle 14). Sowohl in der Suspension als auch in der Lösung trat innerhalb von 24 Stunden eine Eliminierung auf. Bei der Anwesenheit des Feststoffs fiel diese jedoch deutlich größer aus (Tabelle 14). Um im Fall der gelösten Huminstoffe einen Einfluss des pH-Wertes zu testen, wurde der Versuch mit einer filtrierten Huminsäuren-Suspension wiederholt. Hier lagen die Eliminierungsraten zwischen 0 und 4%. Dabei muss aber beachtet werden, dass die Filtration zu einer niedrigeren Konzentration der Huminsäuren in der Inkubationslösung führt. Ein direkter Einfluss des pH-Wertes kann hieraus nicht abgeleitet werden.

Sorptionsstudien unter Einsatz von Huminsäuren und Tonerden haben gezeigt, dass Sulfonamide eine höhere Affinität gegenüber organischen als gegenüber mineralischen Verbindungen aufweisen [71]. Gleichzeitig spielt die Zusammensetzung des organischen Materials eine Rolle. Ein steigender Anteil von Carboxylgruppen, aliphatischen Kohlenstoffresten sowie O- und N-haltigen Strukturelementen förderte in verschiedenen

Studien die Sorption [71,72]. Diese Ergebnisse korrespondieren mit den hier ermittelten Daten. Eine Inkubation in Kieselgel (mineralisches Material) führte zu keiner Eliminierung, so dass die bloße Anwesenheit eines Feststoffs nicht ausschlaggebend ist. Vielmehr spielen seine Oberflächenbeschaffenheit bzw. seine chemische Struktur eine Rolle, was bereits die Inkubation von Sulfonamiden mit unterschiedlich behandelten Maissilagen gezeigt hat (Tabelle 12). Die chemische Struktur einer Verbindung allein trägt nur zum Teil zu der Eliminierung bei. Dies wurde durch die Ergebnisse der Inkubation in partikelfreier Huminsäuren-Lösung deutlich (Tabelle 14). Somit werden die Sorption und damit die Eliminierung von Sulfonamiden durch mehrere Faktoren beeinflusst.

Tabelle 14: Eliminierungsraten der Sulfonamide in Huminsäuren-Lösungen bzw. -Suspensionen unterschiedlicher Konzentrationen

	SDZ				SMZ			
	Konzentration [g kg ⁻¹]				Konzentration [g kg ⁻¹]			
Huminsäuren	1,0	2,5	5,0	7,5	1,0	2,5	5,0	7,5
Lösung*	1	5	6	9	3	6	8	11
Suspension	3	8	15	21	10	19	29	39

Angaben in % als Mittelwert einer Dreifachbestimmung; SDZ - Sulfadiazin, SMZ - Sulfamethazin; * - gelöst durch Zugabe von 1 M Natronlauge

Die höchste Eliminierung wurde bei den untersuchten Standardsubstanzen für die Inkubation mit Lignin erreicht (Tabelle 13). Dies legt nahe, dass die Eliminierung der Sulfonamide bei der Inkubation mit Maissilage unter anderem auf den Ligninanteil zurückgeht. Huminsäuren können durch Abbau- und Umwandlungsprozesse aus Lignin hervorgehen [73]. Diese Makromoleküle weisen somit ähnliche Untereinheiten und Strukturelemente auf. Dies erklärt, warum beide Substanzen zu einer Eliminierung der Sulfonamide geführt haben (Tabelle 13).

Sowohl Huminsäuren als auch Lignin weisen eine komplexe Struktur mit einer Vielzahl von funktionellen Gruppen auf. Im Hinblick auf die untersuchten Strukturelemente spricht dies dafür, dass nicht eine einzelne Gruppe relevant ist, sondern dass auch hier mehrere Faktoren eine Rolle spielen, zum Beispiel die Kombination mehrerer Gruppen oder die räumliche Anordnung. Diese Annahme wird durch Untersuchungen der Sorption von Sulfisoxazol in Boden unterstützt [74]. Die niedrigste Sorption des Sulfonamids wurde in dem Boden mit dem niedrigsten Gehalt organischer Materie (OM) festgestellt. Die höchste Sorption erfolgte andererseits nicht bei dem Boden mit dem größten OM-Anteil [74].

Die Vorbehandlung Lignocellulose-haltiger Substrate dient der besseren Abbaubarkeit von Pflanzeninhaltsstoffen z. B. im Rahmen der Bioethanol- oder auch Biogas-Gewinnung [75]. Lignin wird dabei bei hohen Temperaturen in verdünnten Säuren kaum angegriffen und in Lösung gebracht [75]. Die Behandlung mit Trifluoressigsäure bei 60 °C für 16 Stunden führte

lediglich zu einem teilweisen Abbau der säurelöslichen Lignin-Fraktion [76]. Die beobachteten Unterschiede zwischen den Eliminierungsraten mit Gülle/Maissilage- und Hydrolysatzusatz werden auf diese Zusammenhänge zurückgeführt. Die Säurebehandlung sorgt für einen geringfügigen Abbau des Lignins. Da Lignin als der entscheidende Strukturbestandteil für die Eliminierung identifiziert wurde, führte dies in der Konsequenz zu einer geringeren Eliminierung in den Fermentern mit Hydrolysat-Zugabe im Vergleich zu den Ansätzen mit Zusatz von Maissilage (Tabelle 4). Da der Großteil des Lignins von der Säurebehandlung jedoch unberührt bleibt, konnten auch bei der Hydrolysat-Zugabe hohe Eliminierungsraten beobachtet werden.

Diese Ergebnisse erklären auch, warum der Zusatz von Enzymen zu den Fermentern keinen Einfluss auf die Eliminierung hatte (Tabelle 4). Durch die Enzyme wurden vermutlich Makromoleküle in kleinere Oligomere gespalten. Dies führte zu einer verringerten Viskosität des Fermenterinhalt, was auch in anderen Studien beobachtet wurde [26]. Die Grundstruktur der Ligninmonomere sowie das Lignin selbst bleiben von den eingesetzten Enzymen (z. B. Cellulasen, α -Amylasen) jedoch unverändert. Somit stand die entscheidende Moleküleinheit für die Eliminierung nach wie vor zu Verfügung.

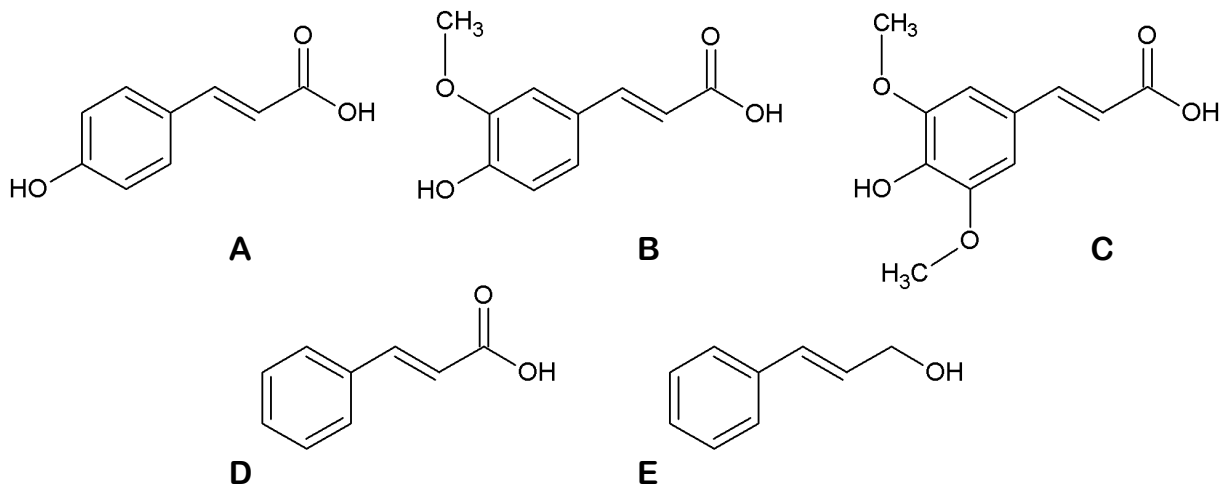


Abbildung 16: Strukturformeln von (A) *p*-Cumarsäure, (B) Ferulasäure, (C) Sinapinsäure, (D) Zimtsäure sowie (E) Zimtalkohol

Der Ligninanteil in Maissilage beträgt bis zu 5% der Trockenmasse [77,78], was bezogen auf das Feuchtgewicht einem Anteil von ca. 2% entspricht. Die Phenole *p*-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol sowie Sinapylalkohol stellen Monomere dar, aus denen Lignin gebildet wird [79]. Anhand der jeweiligen Säuren dieser Monomere (Abbildung 16 A-C) wurde untersucht, welches Strukturelement bzw. welche Substituenten am Benzolring für die Eliminierung der

Sulfonamide verantwortlich sind. Um den Einfluss der Säuregruppe zu ermitteln, wurden zusätzlich Zimtsäure und Zimtalkohol eingesetzt (Abbildung 16 D und E).

Für die Inkubation wurden erneut 125 mg Kieselgel als Trägermatrix verwendet, der Zusatz der gelösten organischen Säuren erfolgte mit 1 bis 3 g kg⁻¹. Diese Gehalte orientieren sich an der zugesetzten Maismenge in den bisherigen Sorptionsstudien (bis zu 15%) sowie dem Ligningehalt der Maissilage (2% des Feuchtgewichts). Der Gesamtreaktionsansatz betrug 1 g, die Inkubation erfolgte für 24 Stunden bei 40 °C.

Tabelle 15: Eliminierungsraten der Sulfonamide nach Inkubation mit Säuremonomeren

Monomer	SDZ			SMZ		
	Konzentration [g kg ⁻¹]			Konzentration [g kg ⁻¹]		
	1	2	3	1	2	3
Zimtalkohol	0	1	3	0	1	2
Zimtsäure	2	1	1	-1	0	0
<i>p</i> -Cumarsäure	-2	-2	-1	1	0	1
Ferulasäure	2	2	3	2	3	3
Sinapinsäure	17	35	48	32	54	64
Sinapinsäure, 48 h	41	57	65	66	76	80
Sinapinsäure ohne Kieselgel	15	22	25	21	28	31

Angaben in % als Mittelwert einer Dreifachbestimmung; sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Inkubation unter Zusatz von 125 mg Kieselgel für 24 Stunden; SDZ - Sulfadiazin, SMZ - Sulfamethazin

Von den untersuchten Verbindungen führte lediglich Sinapinsäure zu einer Eliminierung der Sulfonamide (Tabelle 15). Da alle Verbindungen das Zimtsäure-Grundgerüst aufweisen (Abbildung 16), muss die entscheidende Reaktion mit den weiteren Substituenten am Benzolring zusammenhängen. Eine Hydroxygruppe in *para*-Stellung sowie in Kombination mit einer benachbarten Methoxygruppe hatte keinen Einfluss auf die Eliminierung. Erst bei Anwesenheit einer weiteren Methoxygruppe kam es zu einer Abnahme der Sulfonamid-Konzentration. Bei einer Inkubation über 48 Stunden hinweg war der Rückgang noch stärker ausgeprägt, wobei die Unterschiede von der Ausgangskonzentration der Sinapinsäure abhingen (Tabelle 15). Für die übrigen Monomere wurde auch nach 48 Stunden keine Eliminierung verzeichnet (Daten nicht aufgeführt). Die Anwesenheit von Kieselgel hatte ebenfalls einen Einfluss. Die Eliminierungsrate fiel ohne Feststoff geringer aus, lag aber deutlich über den Ergebnissen der anderen Säuremonomere mit Kieselgel (Tabelle 15).

5.2.5 Einfluss von 2,6-Dimethoxyphenol

Die 2,6-Dimethoxyphenol-Einheit der Sinapinsäure wurde als zentraler Bestandteil für die Eliminierung identifiziert. Neben der Art der Substituenten kann auch deren Anordnung am Benzolring eine Rolle spielen. Aus diesem Grund wurden Lösungen der sechs Dimethoxyphenole zusammen mit Sulfadiazin und Sulfamethazin inkubiert. Angelehnt an die Versuche mit den Säuremonomeren, wurde die Phenole mit einem Gehalt von 2 g kg^{-1} eingesetzt. Um den Einfluss von Kieselgel zu überprüfen, erfolgte die Inkubation sowohl mit als auch ohne Zusatz von 125 mg Kieselgel für 24 Stunden bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

Bei den untersuchten Dimethoxyphenolen trat nur eine Eliminierung auf, wenn die zwei Methoxygruppen in *ortho*- bzw. *ortho*- und *para*-Position zu der Hydroxygruppe angeordnet waren (Tabelle 16). Darüber hinaus wurde die Eliminierung durch die Anwesenheit von Kieselgel verstärkt. Die Extrakte der Proben, die mit 2,4- bzw. 2,6-Dimethoxyphenol und Kieselgel inkubiert wurden, wiesen eine erkennbare rosa bzw. gelbbraune Färbung auf. Die übrigen Extrakte waren farblos oder aufgrund der Ausgangsverbindung schwach gelb gefärbt.

Tabelle 16: Eliminierungsraten der Sulfonamide in Abhängigkeit von Dimethoxyphenolen und Kieselgel

Verbindung	SDZ		SMZ		
	Kieselgel	mit	ohne	mit	ohne
2,3-Dimethoxyphenol		1	1	3	1
2,4-Dimethoxyphenol		18	7	24	13
2,5-Dimethoxyphenol		-2	-2	1	0
2,6-Dimethoxyphenol		43	3	45	6
3,4-Dimethoxyphenol		3	-1	4	0
3,5-Dimethoxyphenol		1	0	2	1
Kontrolle		5	7	5	5
2,4-Dimethylphenol		0	2	-2	3
2,6-Dimethylphenol		-1	4	-2	3
2,4-Dichlorphenol		-1	5	0	3
2,6-Dichlorphenol		1	3	-1	3

Angaben in % als Mittelwert einer Dreifachbestimmung; als Kontrolle diente Reinstwasser; SDZ - Sulfadiazin, SMZ - Sulfamethazin

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden weitere Phenole untersucht. Methoxygruppen üben einen negativen induktiven sowie einen positiven mesomeren Effekt auf die Elektronendichte im Benzolring aus. Gleiches gilt für Chlorsubstituenten, so dass zusätzlich 2,4- und 2,6-Dichlorphenol eingesetzt wurden. Um eine Unterscheidung zwischen dem mesomeren und induktiven Effekt vornehmen zu können, wurden sowohl 2,4- als auch 2,6-Dimethylphenol mit Sulfadiazin und Sulfamethazin inkubiert. Methylgruppen üben nur einen induktiven Effekt aus.

Bei den Extrakten der Chlor- und Methylphenole wurde keine Verfärbung beobachtet und keine der Verbindungen führte zu einer Eliminierung (Tabelle 16). Somit ist nicht nur die Anordnung, sondern auch die Art der Substituenten entscheidend für die Reaktionen, die zu einer Eliminierung führen. Für die weiteren Untersuchungen wurde nur noch die Verbindung 2,6-Dimethoxyphenol eingesetzt.

Um die Reaktionen hinter der Eliminierung aufzuklären, wurden verschiedene Sulfonamide, die N-acetylierte Form vom Sulfamethazin sowie Tetracyclin und Chlortetracyclin zusammen mit Kieselgel mit und ohne 2,6-Dimethoxyphenol inkubiert. Im Fall der Tetracycline zeigte sich, dass das Phenol keinen Einfluss auf deren Eliminierung hatte (Tabelle 17). Aufgrund der hohen Sorptionsneigung der Verbindungen [17,61,80] sorgte die Anwesenheit von Kieselgel in beiden Fällen für einen Rückgang der Ausgangskonzentration. Dies bestätigt die Annahme, dass bei Tetracyclinen und Sulfonamiden unterschiedliche Sorptionsmechanismen bei der Eliminierung relevant sind.

Tabelle 17: Eliminierungsraten der Sulfonamide und Tetracycline bei Inkubation mit Kieselgel in An- und Abwesenheit von 2,6-Dimethoxyphenol

2,6-Dimethoxyphenol Verbindung	mit	ohne
Sulfadiazin	50	0
Sulfamethazin	55	2
N-Acetyl-Sulfamethazin	11	1
Chlortetracyclin	84	88
Tetracyclin	62	67

Angaben in %; Inkubation in Reinstwasser mit und ohne Zusatz von 125 mg Kieselgel für 24 Stunden bei 40 °C

Insgesamt wurden zwölf Sulfonamide und eine N-acetylierte Verbindung getestet. Die Eliminierungsraten lagen für die zwölf Sulfonamide bei der Anwesenheit von Kieselgel zwischen 37% (Sulfamethoxyridazin) und 52% (Sulfamethoxazol), ohne Kieselgel zwischen 0 und 7%. Der Heterozyklus hat somit nur einen geringen Einfluss auf die Eliminierung. Wichtiger ist die Aminogruppe am Benzolring, die bei allen Verbindungen vorhanden ist (vergleiche Abbildung 2). Bei N-Acetyl-Sulfamethazin ist diese Gruppe nicht mehr frei zugänglich, sondern durch eine Acetylgruppe blockiert. Die N-Acetylierung stellt eine Biotransformation im menschlichen und tierischen Organismus dar und hat einen Rückgang der antibiotischen Wirksamkeit der Verbindung zur Folge [81-84]. Die Acetylgruppe führte dazu, dass die Eliminierung der Verbindung im Vergleich zu Sulfamethazin deutlich geringer ausfiel (Tabelle 17). Die Acetylierung ist eine reversible Reaktion. Bei Lagerung von N-Acetylsulfadiazin in Schweinegülle wurde eine Abnahme der Konzentration beobachtet, die von einem Anstieg der Sulfadiazin-Konzentration begleitet wurde [58,83]. Dies wird als Ursache dafür angesehen, dass bei der Inkubation von N-Acetyl-

Sulfamethazin mit Kieselgel eine höhere Eliminierungsrate als in der Kontrolle beobachtet wurde (Tabelle 17). Während der 24-stündigen Inkubation hat wahrscheinlich eine partielle Hydrolyse der Esterbindung stattgefunden, wodurch eine Eliminierung des freigesetzten Sulfamethazins ermöglicht wurde.

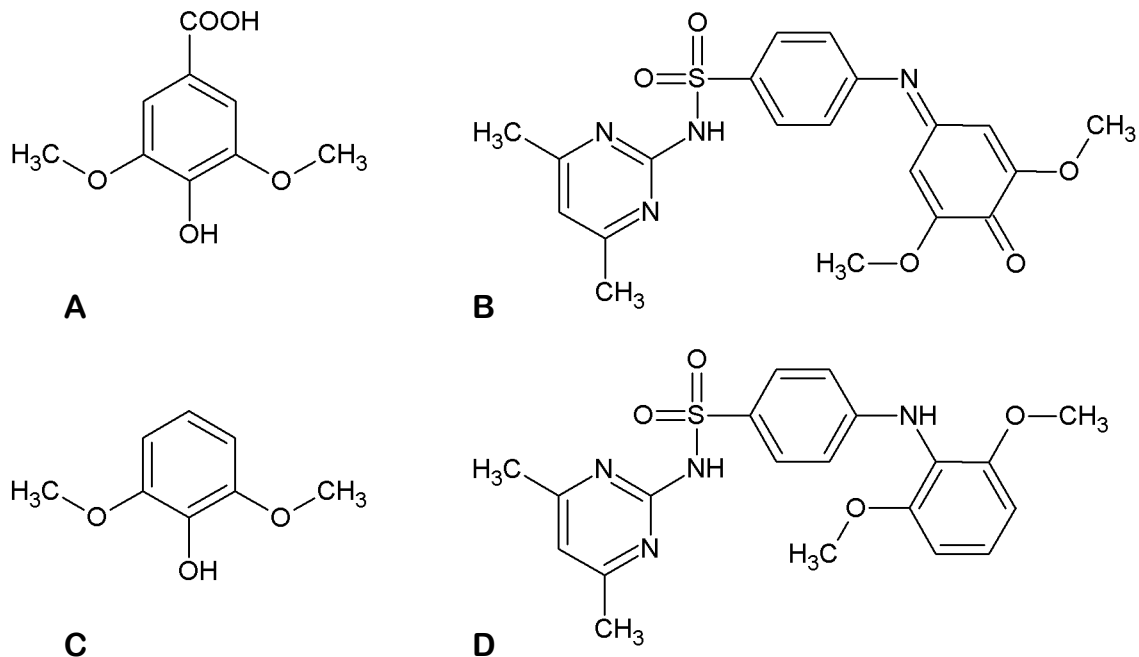


Abbildung 17: Strukturen von (A) Syringasäure und (B) dem von Bialk *et al.* [85] identifizierten Addukt mit Sulfamethazin, (C) 2,6-Dimethoxyphenol und (D) dem in dieser Studie detektierten Sulfamethazin-Addukt

Bialk *et al.* untersuchten analog zu diesem Projekt die Reaktion von Sulfonamiden mit verschiedenen organischen Säuren und Phenolen [85]. Neben dem 2,6-Dimethoxyphenol-Grundbaustein wurde auch eine Abnahme der Sulfonamid-Konzentration in Gegenwart von 1,2-Diphenolen beobachtet. Die Reaktionen wurden in Gegenwart von Peroxidasen und Wasserstoffperoxid sowie bei der Inkubation mit Birnessit (MnO₂) durchgeführt. Dies ist vergleichbar mit dem hier durchgeführten Ansatz mit Kieselgel. Die Autoren isolierten und charakterisierten ein nach Decarboxylierung der Syringasäure gebildetes Addukt (Abbildung 17 A und B). Ein vergleichbares Produkt konnte nach der Inkubation mit 2,6-Dimethoxyphenol nicht identifiziert werden. Stattdessen wurde eine Verbindung detektiert, deren Masse-Ladungsverhältnis einem Sulfonamid-Phenol-Addukt nach Wasserabspaltung entspricht. Dieses wies die für Sulfamethazin charakteristischen Fragmente von 186 und 124 *m/z* auf, so dass die in Abbildung 17 D gezeigte Struktur vermutet wird. Für diese Struktur sprechen auch die Ergebnisse der Inkubation von N-Acetyl-Sulfamethazin, wo keine Eliminierung aufgrund der Blockade der Aminogruppe stattfand.

Bei Inkubation der Proben mit Kieselgel und 2,6-Dimethoxyphenol wurde im Laufe der Zeit eine Verfärbung von gelb nach orange-braun beobachtet. Nach mehreren Tagen waren schwarze Flocken zu erkennen. Diese traten auch in Abwesenheit der Sulfonamide auf (Abbildung 18). Als Ursache wurde eine Polymerisierung des Phenols angesehen. Für 2,6-disubstituierte Phenole wurden oxidative Kupplungsprozesse beschrieben, die zu einem linearen Polymer führen können, in dem die Monomere über Etherbindungen miteinander verknüpft werden [86]. Um zu überprüfen, ob die Hydroxylgruppe an der Polymerisation beteiligt war, wurde anhand des Folin-Ciocalteu-Reagenz der Anteil der freien Hydroxygruppen bestimmt. Dieser ging im Laufe von acht Wochen auf 10% zurück.

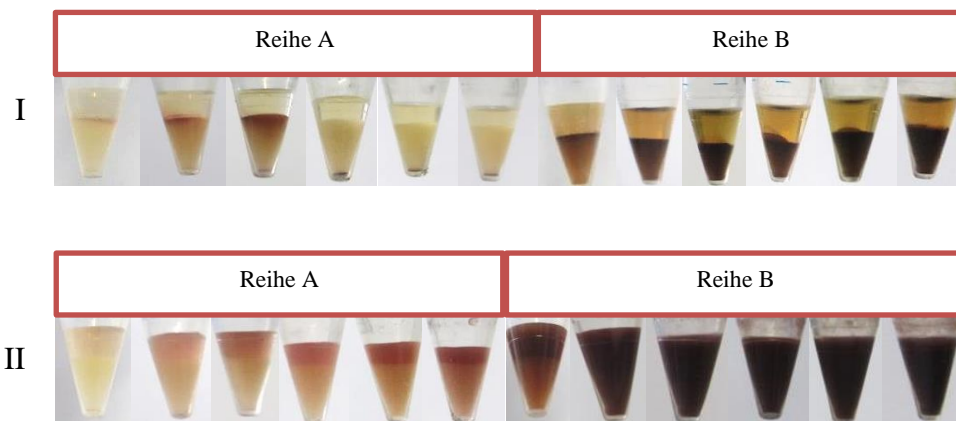


Abbildung 18: Inkubation von 2,6-Dimethoxyphenol mit Kieselgel; gezeigt sind die Proben (I) nach dem Zentrifugieren und (II) kurze Zeit nach dem Aufschlännen mit (A) $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ und (B) $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ Ausgangskonzentration des Phenols; Probennahmezeitpunkte (v.l.n.r.) 4 d, 11 d, 18 d, 25 d, 32 d, 39 d

Um zu untersuchen, ob die Adduktbildung mit dem Phenol oder die Sorption an das gebildete Polymer für die Eliminierung der Sulfonamide relevant sind, wurde 2,6-Dimethoxyphenol für 46 Tage mit Kieselgel inkubiert. Bei einem Ansatz wurden die Sulfonamide anschließend direkt zu der überstehenden Lösung gegeben („Langzeitinkubation“). In einem anderen Ansatz wurde die überstehende Lösung entfernt und durch Reinstwasser ersetzt („Langzeitinkubation ohne Überstand“). Als Kontrolle diente ein Ansatz mit frischem 2,6-Dimethoxyphenol („Kurzzeitinkubation“), der wie die anderen Proben nach Zusatz der Sulfonamide für 46 Stunden inkubiert wurde. Die Auswertung ergab, dass nur bei der Kurzzeitinkubation eine ausgeprägte Eliminierung der Sulfonamide stattfand (Tabelle 18). Bei den Ansätzen der Langzeitinkubationen kam es zu einer Eliminierung von 5 bis 10%. Dies könnte auf verbleibende Monomere zurückgehen oder auf eine Sorption der Sulfonamide an dem Polymer. Letzteres würde allerdings nur einen geringen Beitrag zu der Eliminierung leisten. Wäre die Interaktion mit dem Polymer der entscheidende Eliminierungsweg, hätte bei der Langzeitinkubation eine höhere Eliminierung beobachtet werden müssen.

Tabelle 18: Eliminierungsraten der Sulfonamide in Abhängigkeit von der Inkubationszeit des 2,6-Dimethoxyphenols

2,6-Dimethoxyphenol	SDZ	SMZ
Kurzzeitinkubation	70	82
Langzeitinkubation	7	14
Langzeitinkubation ohne Überstand	5	10

Angaben in % als Mittelwert einer Dreifachbestimmung; SDZ - Sulfadiazin, SMZ - Sulfamethazin

Die Bindung von aromatischen Aminen oder speziell Sulfonamiden an Huminsäuren wurde in mehreren Studien untersucht. Für Anilin wurde die Bildung einer kovalenten Bindung mit Quinonen oder anderen Carbonylverbindungen beschrieben [87]. Für Sulfamethazin wurde ebenfalls eine Bindung an Quinon-Einheiten von Huminsäuren durch eine nukleophile Addition dargestellt [88]. Dieser Prozess entspricht einer Chemisorption. Tetracycline scheinen diesem Prozess nicht (in diesem Umfang) zu unterliegen. Für Tetracyclin wurden als Sorptionsprozesse Wasserstoffbrückenbindungen zwischen aciden Gruppen von Huminsäuren und polaren Gruppen der Tetracycline, Ionenaustausch sowie die Komplexbildung mit zweiwertigen Kationen angegeben [89]. Derartige Prozesse entsprechen einer Physisorption. Dies ist wahrscheinlich die Erklärung dafür, dass Tetracycline trotz ihrer starken Sorption in größerem Umfang aus natürlichen Matrices (Gülle, Maissilage, Boden) extrahiert werden können als Sulfonamide (Tabelle 4, Abbildung 15, [44,65,90]). Die kovalenten Bindungen zwischen Sulfonamiden und Matrixbestandteilen können nur durch drastische Extraktionsbedingungen wie bei der Mikrowellenextraktion gelöst werden [66].

5.3 Sorption als Güllebehandlungsmethode

Für Sulfonamide und Tetracycline konnte eine Sorption an Maissilage festgestellt werden. Verschiedene Ansätze führten jedoch nicht zu einer vollständigen Eliminierung der Verbindungen, auch wenn bis zu 15% Maissilage der Gülle hinzugefügt wurden (Kapitel 5.2.1). Sulfonamide sind dafür bekannt, dass sie in Bodenmatrices eine starke Sorption zeigen und sogenannte nicht-extrahierbare Rückstände (NER) bilden. Werden Bodenproben mit Sulfonamiden dotiert, kann oft bereits nach sieben Tagen nur ein geringer Anteil (<10%) der Ausgangskonzentration extrahiert werden [65]. Der Einsatz harscher Bedingungen wie bei der Mikrowellenextraktion (hohe Temperatur, hoher Druck) kann zu einer höheren Effizienz bei der Extraktion führen (Wiederfindung >70% nach 8 Tagen, [66]). Bei gealterten Proben sinkt aber auch bei diesen Methoden die Extrahierbarkeit der Sulfonamide (Wiederfindung >45% nach 218 Tagen, [66]). In einem Testsystem bestehend aus einer Wasser- und einer Bodenphase verlagerten sich die zugesetzten Sulfonamide im Laufe der Inkubation in die Bodenphase, während Tetracyclin von Beginn an praktisch nicht in der wässrigen Phase vorhanden war (<1%) [44]. Die hohe Affinität zur Bodenmatrix könnte eine Möglichkeit darstellen, Antibiotika aus der Gülle zu entfernen.

Um diesen Punkt zu überprüfen, wurde zentrifugierte Gülle mit verschiedenen Anteilen an Erde (schwach lehmiger Sand) versetzt und für 7 Tage bei 40 °C inkubiert. Als Vergleich diente ein Ansatz mit Reinstwasser. Die Proben wurden zu Beginn einmal homogenisiert, um eine Befeuchtung der Bodenmatrix zu erreichen, und danach stehend im Dunkeln bei 40 °C gelagert. Anschließend wurde der Überstand analysiert. Die Inkubation in Wasser ergab lediglich für Chlortetracyclin eine Eliminierung, die anderen Verbindungen waren unter den Bedingungen stabil (Tabelle 19). Der Zusatz von Erde führte bei den Tetracyclinen zu einer praktisch vollständigen Eliminierung. Die Sulfonamide waren noch in der überstehenden Lösung detektierbar, im Vergleich zu der Kontrolle war die Eliminierungsrate jedoch deutlich erhöht (Tabelle 19).

Tabelle 19: Eliminierungsraten der Antibiotika in Wasser und Gülle mit Zusatz von Erde

Matrix	Anteil Erde [%]	SDZ	SMZ	TC	CTC	CTC + isoCTC
Wasser		-6	6	6	32	22
Wasser	50	25	48	>99	>99	>99
Gülle		34	47	41	74	43
Gülle	20	39	56	73	78	73
Gülle	33	34	55	84	86	83
Gülle	43	41	61	90	91	90
Gülle	50	43	65	93	93	92

Angaben in % als Ergebnis einer Einfachbestimmung (Gülle) bzw. Dreifachbestimmung (Wasser); SDZ - Sulfadiazin, SMZ - Sulfamethazin; TC - Tetracyclin; (iso)CTC - (iso-)Chlortetracyclin

In Gülle wurde für alle Verbindungen eine Eliminierung festgestellt (Tabelle 19). Bei den Tetracyclinen kam es mit zunehmendem Anteil der Erde in dieser Matrix zu einem Anstieg der Eliminierungsrate. Im Unterschied zu der Inkubation in Wasser konnten die Verbindungen jedoch auch nach 7 Tagen noch in der Flüssigphase nachgewiesen werden. Der Einfluss des Erdzusatzes war für Sulfonamide in der Gülle weniger ausgeprägt als im Wasser. Die Verbindungen wiesen bereits in der zentrifugierten Gülle eine Eliminierungsrate von 34 bzw. 47% auf. Diese stieg beim Zusatz von Erde lediglich auf 43 bzw. 65% an (Tabelle 19).

Vor diesem Hintergrund ist die Entfernung von Sulfonamiden und Tetracyclinen aus der Gülle mittels Erde keine Option. Selbst bei einem Zusatz von 50% Erde zu der Gülle konnte ein Großteil der Sulfonamide noch im Überstand nachgewiesen werden. Zwar konnten über 90% der Tetracycline aus der Flüssigphase entfernt werden. Ein Erdanteil von 50% im Lagerbehältnis ist jedoch nicht praktikabel, zum Beispiel im Hinblick auf die Pumpbarkeit der Gülle oder auf den zusätzlich erforderlichen Lagerbedarf. Eine Filtration der Gülle über einen „Erdfilter“ könnte die Eliminierungsrate unter Umständen erhöhen. Allerdings wäre gerade

Rindergülle aufgrund des hohen Feststoffanteils nur unter sehr hohem Energieaufwand filtrierbar. Aus diesem Grund wurde dieser Ansatz der Güllebehandlung nicht weiter verfolgt.

Die Matrix Gülle führte zu einer veränderten Stabilität der Antibiotika in der Flüssigphase. Der Einfluss von matrixeigenen Partikeln bzw. Bestandteilen auf die Eliminierung wurde auch deutlich, als die Verbindungen in verschiedenen Güllematrices für 7 Tage bei 40 °C inkubiert wurden (Tabelle 20). Der Vergleich zeigt, dass für die gleiche Verbindung zum Teil sehr unterschiedliche Ergebnisse auftraten. Für Sulfamethazin wurden zum Beispiel Eliminierungsraten zwischen 4 und 55% erhalten (Tabelle 20). Eine Korrelation mit einem Substratparameter wie der Trockensubstanz oder dem pH-Wert war nicht auszumachen.

Tabelle 20: Eliminierungsraten der Antibiotika nach siebentägiger Inkubation in verschiedenen Güllematrices und Gärresten

Matrix	SDZ	SMZ	TC	CTC	CTC + isoCTC
Rindergülle	3	18	18	64	56
Rindergülle	21	42	28	78	68
Milchviehgülle	11	23	26	65	58
Schweinegülle	-5	4	24	83	62
Schweinegülle	2	11	14	54	25
Gärrest	39	55	38	87	73
Gärrest	22	38	35	87	69
Gärrest	17	32	39	72	66
Gärrest	11	23	33	87	64
Gärrest	25	43	35	76	66
fermentierte Gülle, gesiebt	4	15	21	68	58
fermentierte Gülle, zentrifugiert	31	46	44	87	68

Angaben in % als Ergebnis einer Einfachbestimmung

Diese Ergebnisse liefern eine mögliche Erklärung für Daten aus der Fachliteratur. In vielen Studien wurde die Eliminierung von Antibiotika in Gülle untersucht. Dabei traten bei ähnlichen Versuchsdurchführungen zum Teil Unterschiede von 100% auf (siehe Übersicht in [3]). Die Eliminierung von Antibiotika hängt damit nicht nur von dem experimentellen Aufbau, sondern maßgeblich auch von der verwendeten Güllematrix ab. Bemerkenswert waren dabei die Ergebnisse, die für fermentierte Gülle erhalten wurden. Diese wurde in einem Fall gesiebt (1 mm) und in einem anderen Fall zentrifugiert (3750 g). Letzteres führte dazu, dass die Eliminierungsrate aller Verbindungen anstieg (Tabelle 20). Die Eliminierung scheint damit von einem Zusammenspiel aus Makro- und Mikropartikel abzuhängen. Eine von der

Partikelgröße abhängige Adsorption und Desorption wurde bereits im Boden festgestellt [8] und scheint auch hier zu gelten.

In den verwendeten Matrices handelte es sich bei den Partikeln jeweils um matrixeigenen Feststoff, Maissilage wurde nicht zugesetzt. Größere Partikel scheinen die Antibiotika zu stabilisieren, die Substanzen können aber im Rahmen der Probenvorbereitung extrahiert werden. Kleinere Partikel führen demnach zu einer stärkeren Sorption und damit zu einer höheren Eliminierungsrate. Eine Stabilisierung der Antibiotika durch Feststoffe wurde bereits im Zusammenhang mit den semi-kontinuierlichen Fermenterstudien vermutet. Tetracyclin zeigte unter thermophilen Bedingungen eine geringere Eliminierung, wenn Hydrolysat zugesetzt wurde (Tabelle 4 sowie Kapitel 3.3.2). Da in der Flüssigphase eine thermisch bedingte Eliminierung zu erwarten gewesen wäre, muss eine Sorption an der Hydrolysat-Oberfläche stattgefunden haben. Im Zuge der Probenvorbereitung konnte dann eine Desorption erfolgen.

5.4 Reversibilität der Sorption

Sorption wird als ein wichtiger Eliminierungsweg für Antibiotika im Boden angesehen. Studien haben gezeigt, dass die Sorption im Boden dort durch den Zusatz von Gülle verstärkt werden kann [62]. Ein Großteil der aufgegebenen Antibiotika wird so im Oberboden fixiert. Trotz der starken Sorption können Antibiotika jedoch aus dem Boden ausgewaschen und in wasserführende Schichten verlagert werden [6,65,91-94]. Die Sorption im Boden ist somit potentiell reversibel und dies ist auch in der Matrix Gülle denkbar.

Um die Reversibilität der Sorption zu überprüfen, wurden 40 g Gülle zusammen mit 1 g Maissilage inkubiert. Die Antibiotika wurden der Gülle mit einem Gehalt von 20 mg kg^{-1} (Sulfonamide) bzw. 80 mg kg^{-1} (Tetracycline) zugesetzt. Nach 24 Stunden wurden 35 g der Flüssigphase entfernt und durch 35 g antibiotikafreie Gülle ersetzt. Dieses Vorgehen erfolgte analog nach 48, 72 und 144 Stunden. Nach 144 Stunden wurde zusätzliche die Festphase isoliert. Die Messdaten wurden den berechneten Sollwerten gegenübergestellt und die Wiederfindung in Prozent angegeben (Tabelle 21). Basierend auf der Massenbilanz wurde die Eliminierungsrate berechnet.

Nach 24 Stunden wurde für alle Verbindungen in der Flüssigphase ein geringerer Gehalt als der Sollwert ermittelt (Tabelle 21). Dies spricht für eine Eliminierung durch Sorption an der Maissilage. Für die Tetracycline wurde nur eine geringe Bildung der Transformationsprodukte beobachtet ($<20 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$), so dass dieser Aspekt hier nicht weiter berücksichtigt wird. Für die Proben nach 48 und 72 Stunden fällt auf, dass die Abweichungen zwischen Soll- und Ist-Wert zunahmten. Durch die kurze Inkubation in Gülle kam es nicht zu einer Desorption der Analyten, sondern zu einer Verlagerung der Substanzen in die Festphase.

Tabelle 21: Desorption der Antibiotika in Güllematrix

Entnahme nach	SDZ					SMZ			TC			CTC + isoCTC	
	Gehalt	soll	ist	%	ist	%	soll	ist	%	ist	%		
24 Stunden	19,51	18,93	97	14,91	76	78,05	66,97	86	69,91	90			
48 Stunden	2,86	2,19	77	1,69	59	11,42	6,92	61	7,13	62			
72 Stunden	0,42	0,24	57	0,18	43	1,67	0,84	51	0,79	47			
144 Stunden	0,06	0,04	65	0,04	72	0,24	0,23	95	0,23	95			
144 Stunden (s)		0,05		0,05			3,44		5,83				
Eliminierungsrate			6		24			16		12			
24 Stunden	19,51	18,26	94	13,34	68	78,05	58,69	75	59,21	76			
48 Stunden	2,86	2,01	70	1,51	53	11,42	6,08	53	5,80	51			
72 Stunden	0,42	0,26	61	0,19	45	1,67	0,91	55	0,90	54			
144 Stunden	0,06	0,05	81	0,04	72	0,24	0,28	116	0,30	123			
144 Stunden (s)		0,04		0,04			3,30		5,43				
Eliminierungsrate			10		32			26		26			
24 Stunden	19,51	13,97	72	11,05	57	78,05	65,36	84	72,19	92			
48 Stunden	2,86	1,75	61	1,39	49	11,42	7,18	63	7,39	65			
72 Stunden	0,42	0,20	48	0,15	36	1,67	0,83	50	0,86	52			
144 Stunden	0,06	0,04	63	0,03	52	0,24	0,28	115	0,29	118			
144 Stunden (s)		0,03		0,04			3,99		6,87				
Eliminierungsrate			30		43			17		9			

Angaben in mg kg^{-1} , (s) - Festphase

Im Unterschied dazu führte eine längere Inkubation der Maissilage in antibiotikafreier Gülle zu einer partiellen Freisetzung der Analyten aus der Festphase (Ergebnis nach 144 Stunden, Tabelle 21). Für die Sulfonamide kam es zu einem Anstieg der Prozentrate bei der Gegenüberstellung von Soll- und Ist-Wert. Allerdings blieben die Gehalte unter den theoretisch möglichen Werten (Tabelle 21). Dennoch deutet der Anstieg auf eine Desorption der Analyten hin. Ein Vergleich der Werte für die Flüssig- und Festphase nach 144 Stunden zeigt, dass die Gehalte in den beiden Phasen nahezu identisch sind. Dies entspricht den in Gülle bestimmten Sorptionskoeffizienten, wenn Gülle mit matrixeigenem Feststoff inkubiert wurde [44].

Für die Tetracycline fällt das Ergebnis der Desorption deutlicher aus. Hier konnte in der Flüssigphase nach 144 Stunden zum Teil mehr als der theoretisch mögliche Gehalt ermittelt werden (Tabelle 21). Auch wenn die analytische Methodenpräzision berücksichtigt wird, fällt der Unterschied zu den Raten nach 72 Stunden auf (110% im Vergleich zu 52%). Die Analyse der Festphase ergab, dass die Tetracycline in dieser in einem höheren Gehalt auftraten als in

der Flüssigphase (Tabelle 21). Analog zu den Sulfonamiden entspricht dies den für Gülleproben ermittelten Sorptionskoeffizienten [44].

Die Ergebnisse zeigen, dass die Eliminierung durch Sorption reversibel ist. Es wird nur ein geringer Teil der Sulfonamide aus der Maissilage wieder freigesetzt, diese Freisetzung kann aber über einen langen Zeitraum erfolgen. Für Bodenproben und die Verlagerung von Sulfonamiden in wasserführende Schichten wurde dies bereits gezeigt [6]. Eine Möglichkeit zur Verringerung des Antibiotikaeintrags in die Umwelt könnte die Separierung der festen und flüssigen Phase vor der Ausbringung von Gülle und Gärresten sein. Hierbei ist aber zu bedenken, dass gerade die Festphase zur Verbesserung der Bodenstruktur beiträgt. Da Sorption den wichtigsten Eliminierungsweg für die untersuchten Antibiotika darstellt, kann eine nachhaltige Eliminierung im Sinne eines Substanzabbaus durch eine Güllebehandlung nicht erzielt werden. Ziel muss es deswegen sein, den Antibiotikaeinsatz in der Tierhaltung weiter zu reduzieren. Nach derzeitigem Kenntnisstand kann nur so der Antibiotika-Eintrag über die Gülle in die Umwelt verringert werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R (2015) Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (18):5649-5654 doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
2. BVL (2018) Menge der abgegebenen Antibiotika in der Tiermedizin sinkt weiter; Pressemitteilung vom 23.07.2018.
3. Spielmeyer A (2018) Occurrence and fate of antibiotics in manure during manure treatments: A short review. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 9:76-86 doi:<https://doi.org/10.1016/j.scp.2018.06.004>
4. Wohde M, Berkner S, Junker T, Konradi S, Schwarz L, Düring R-A (2016) Occurrence and transformation of veterinary pharmaceuticals and biocides in manure: a literature review. *Environmental Sciences Europe* 28 (1):23 doi:10.1186/s12302-016-0091-8
5. Statistisches Bundesamt (Destatis), Die Hälfte der Landwirte düngt mit Gülle. online verfügbar unter <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/Wirtschaftsbereiche/LandForstwirtschaftFischerei/Produktionsmethoden/AktuellDuengung.html>
6. Spielmeyer A, Höper H, Hamscher G (2017) Long-term monitoring of sulfonamide leaching from manure amended soil into groundwater. *Chemosphere* 177:232-238 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.020>
7. Höltge S, Kreuzig R (2007) Laboratory Testing of Sulfamethoxazole and its Metabolite Acetyl-Sulfamethoxazole in Soil. *CLEAN – Soil, Air, Water* 35 (1):104-110 doi:10.1002/clen.200600019
8. Thiele-Bruhn S, Seibicke T, Schulten HR, Leinweber P (2004) Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. *Journal of Environmental Quality* 33 (4):1331-1342
9. Fachverband Biogas e.V., http://www.biogas.org/edcom/webfvb.nsf/id/de_branchenzahlen (2018).
10. Scheftelowitz M, Rensberg N, Denysenke V, Daniel-Gromke J, Stinner W, Hillebrand K, Naumann K, Peetz D, Hennig C, Thrän D, Beil M, Kasten J, Vogel L (2015) Stromerzeugung aus Biomasse (Vorhaben IIa Biomasse). Zwischenbericht Mai 2015, online verfügbar unter https://www.dbfz.de/fileadmin/eeg_monitoring/berichte/01_Monitoring_ZB_Mai_2015.pdf bzw <https://www.dbfz.de/index.php?id=587&L=0>
11. Statistisches Bundesamt (Destatis), Fachserie 3 Reihe 4.1, Land- und Forstwirtschaft, Fischerei - Viehbestand (2017). Artikelnummer 2030410165324 online verfügbar unter <https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/LandForstwirtschaft/ViehbestandTierischeErzeugung/Viehbestand.html>
12. Weiland P (2010) Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85 (4):849-860 doi:DOI 10.1007/s00253-009-2246-7
13. Merlin Christy P, Gopinath LR, Divya D (2014) A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 34:167-173 doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.010>
14. Preissler D, Shah A, Zielonka S, Lemmer A, Oechsner H, Jungbluth T (2008) Untersuchungen zur Hydrolyse von Maissilage. *Landtechnik* 63 (1):30-31
15. Marín Pérez C, Weber A (2013) Zweiphasiges Biogasverfahren: Hydrolyse unterschiedlicher Substrattypen. *Landtechnik* 68 (4):252-255
16. Wallmann J, Reimer I, Heberer T (2016) Abgabemengenerfassung antimikrobiell wirksamer Stoffe in Deutschland 2015. *Deutsches Tierärzteblatt* (11):1650-1657

17. Halling-Sørensen B, Sengeløv G, Tjørnelund J (2002) Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42 (3):263-271 doi:DOI 10.1007/s00244-001-0017-2
18. Insam H, Gómez-Brandón M, Ascher J (2015) Manure-based biogas fermentation residues - Friend or foe of soil fertility? *Soil Biology & Biochemistry* 84:1-14 doi:10.1016/j.soilbio.2015.02.006
19. Aschmann V, Effenberger M, Gronauer A, Kaiser F, Kissel R, Mitterleitner H, Nesor S, Schlattmann M, Speckmaier M, Ziehfrend G (2007) *Biogashandbuch Bayern - Materialienband - Kapitel1 "Grundlagen und Technik"*. Bayrisches Landesamt für Umwelt, online verfügbar unter <http://www.lfubayernde/energie/biogashandbuch/indexhtm>
20. Waller CW, Hutchings BL, Wolf CF, Goldman AA, Broschard RW, Williams JH (1952) Degradation of aureomycin. VI. Isoaureomycin and aureomycin. *Journal of the American Chemical Society* 74:4981
21. Doi AM, Stoskopf MK (2000) The Kinetics of Oxytetracycline Degradation in Deionized Water under Varying Temperature, pH, Light, Substrate, and Organic Matter. *Journal of Aquatic Animal Health* 12 (3):246-253 doi:[https://doi.org/10.1577/1548-8667\(2000\)012<0246:TKOODI>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(2000)012<0246:TKOODI>2.0.CO;2)
22. Loftin KA, Adams CD, Meyer MT, Surampalli R (2008) Effects of ionic strength, temperature, and pH on degradation of selected antibiotics. *Journal of Environmental Quality* 37 (2):378-386 doi:<https://doi.org/10.2134/Jeq2007.0230>
23. Søbørg T, Ingerslev F, Halling-Sørensen B (2004) Chemical stability of chlortetracycline and chlortetracycline degradation products and epimers in soil interstitial water. *Chemosphere* 57 (10):1515-1524 doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.09.020>
24. Bialk-Bielinska A, Stolte S, Matzke M, Fabianska A, Maszkowska J, Kolodziejska M, Liberek B, Stepnowski P, Kumirska J (2012) Hydrolysis of sulphonamides in aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials* 221:264-274 doi:DOI 10.1016/j.jhazmat.2012.04.044
25. Spielmeyer A, Ahlborn J, Hamscher G (2014) Simultaneous determination of 14 sulfonamides and tetracyclines in biogas plants by liquid-liquid-extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (11):2513-2524 doi:DOI 10.1007/s00216-014-7649-3
26. Ellenrieder J, Schieder D, Mayer W, Faulstich M (2010) Combined mechanical enzymatic pretreatment for an improved substrate conversion when fermenting biogenic resources. *Engineering in Life Sciences* 10 (6):544-551 doi:10.1002/elsc.201000078
27. Bruni E, Jensen AP, Angelidaki I (2010) Comparative study of mechanical, hydrothermal, chemical and enzymatic treatments of digested biofibers to improve biogas production. *Bioresource Technology* 101 (22):8713-8717 doi:DOI 10.1016/j.biortech.2010.06.108
28. Romano RT, Zhang RH, Teter S, McGarvey JA (2009) The effect of enzyme addition on anaerobic digestion of Jose Tall Wheat Grass. *Bioresource Technology* 100 (20):4564-4571 doi:DOI 10.1016/j.biortech.2008.12.065
29. Akyol Ç, Aydin S, Ince O, Ince B (2016) A comprehensive microbial insight into single-stage and two-stage anaerobic digestion of oxytetracycline-medicated cattle manure. *Chemical Engineering Journal* 303:675-684 doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.06.006>
30. De Gioannis G, Muntoni A, Poletti A, Pomi R, Spiga D (2017) Energy recovery from one- and two-stage anaerobic digestion of food waste. *Waste Management* 68:595-602 doi:<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.06.013>
31. Nasr N, Elbeshbishy E, Hafez H, Nakhla G, Hesham El Naggar M (2012) Comparative assessment of single-stage and two-stage anaerobic digestion for the treatment of thin stillage. *Bioresource Technology* 111:122-126 doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.019>

32. Lindner J, Zielonka S, Oechsner H, Lemmer A (2016) Is the continuous two-stage anaerobic digestion process well suited for all substrates? *Bioresource Technology* 200:470-476 doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.052>
33. Varel VH, Wells JE, Shelver WL, Rice CP, Armstrong DL, Parker DB (2012) Effect of anaerobic digestion temperature on odour, coliforms and chlortetracycline in swine manure or monensin in cattle manure*. *Journal of Applied Microbiology* 112 (4):705-715 doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05250.x>
34. Meng Y, Jost C, Mumme J, Wang K, Linke B (2016) An analysis of single and two stage, mesophilic and thermophilic high rate systems for anaerobic digestion of corn stalk. *Chemical Engineering Journal* 288:79-86 doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.11.072>
35. Gallert C, Winter J (1997) Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic wastes: effect of ammonia on glucose degradation and methane production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48 (3):405-410
36. Hashimoto AG, Varel VH, Chen YR (1981) Ultimate methane yield from beef-cattle manure - Effect of temperature, ration constituents, antibiotics and manure age. *Agricultural Wastes* 3 (4):241-256 doi:[https://doi.org/10.1016/0141-4607\(81\)90011-1](https://doi.org/10.1016/0141-4607(81)90011-1)
37. Moset V, Poulsen M, Wahid R, Højberg O, Møller Henrik B (2015) Mesophilic versus thermophilic anaerobic digestion of cattle manure: methane productivity and microbial ecology. *Microbial Biotechnology* 8 (5):787-800 doi:10.1111/1751-7915.12271
38. Yu D, Kurola JM, Lähde K, Kymäläinen M, Sinkkonen A, Romantschuk M (2014) Biogas production and methanogenic archaeal community in mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion processes. *Journal of Environmental Management* 143:54-60 doi:<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.04.025>
39. Ahmed MB, Zhou JL, Ngo HH, Guo W, Johir MAH, Sornalingam K (2017) Single and competitive sorption properties and mechanism of functionalized biochar for removing sulfonamide antibiotics from water. *Chemical Engineering Journal* 311:348-358 doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.106>
40. Spielmeyer A, Stahl F, Petri MS, Zerr W, Brunn H, Hamscher G (2017) Transformation of sulfonamides and tetracyclines during anaerobic fermentation of liquid manure. *Journal of Environmental Quality* 46 (1):160-168 doi:<https://doi.org/10.2134/jeq2016.04.0152>
41. Mohring SAI, Strzysch I, Fernandes MR, Kiffmeyer TK, Tuerk J, Hamscher G (2009) Degradation and elimination of various sulfonamides during anaerobic fermentation: a promising step on the way to sustainable pharmacy? *Environmental Science & Technology* 43 (7):2569-2574 doi:<https://doi.org/10.1021/Es802042d>
42. Zheng H, Wang Z, Zhao J, Herbert S, Xing B (2013) Sorption of antibiotic sulfamethoxazole varies with biochars produced at different temperatures. *Environmental Pollution* 181:60-67 doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.056>
43. Szczepaniak W, Szymański A (2000) Relationship between hydrophobic properties of amphoteric sulfonamides and their retention in micellar reversed phase liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 23 (8):1217-1231 doi:10.1081/jlc-100100410
44. Bailey C, Spielmeyer A, Hamscher G, Schüttrumpf H, Frings RM (2016) The veterinary antibiotic journey: comparing the behaviour of sulfadiazine, sulfamethazine, sulfamethoxazole and tetracycline in cow excrement and two soils. *Journal of Soils and Sediments* 16 (6):1690-1704 doi:<https://doi.org/10.1007/s11368-016-1370-0>
45. Mikulski CM, Fleming J, Fleming D, Karayannis NM (1988) Chelates of Tetracycline with 1st Row Transition-Metal Perchlorates. *Inorganica Chimica Acta* 144 (1):9-16
46. Stephens CR, Murai K, Brunings KJ, Woodward RB (1956) Acidity Constants of the Tetracycline Antibiotics. *Journal of the American Chemical Society* 78 (16):4155-4158

47. Ohyama T, Cowan JA (1995) Calorimetric Studies of Metal-Binding to Tetracycline - Role of Solvent Structure in Defining the Selectivity of Metal Ion-Drug Interactions. *Inorganic Chemistry* 34 (11):3083-3086 doi:Doi 10.1021/Ic00115a040
48. Carlotti B, Cesaretti A, Elisei F (2012) Complexes of tetracyclines with divalent metal cations investigated by stationary and femtosecond-pulsed techniques. *Physical Chemistry Chemical Physics* 14 (2):823-834 doi:10.1039/c1cp22703c
49. Jezowska-Bojczuk M, Lambs L, Kozlowski H, Berthon G (1993) Metal Ion-Tetracycline Interactions in Biological-Fluids .10. Structural Investigations on Copper(II) Complexes of Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline, 4-(Dedimethylamino)Tetracycline, and 6-Deoxy-6-Demethyltetracycline and Discussion of Their Binding Modes. *Inorganic Chemistry* 32 (4):428-437 doi:Doi 10.1021/Ic00056a015
50. Lambs L, Decocklereverend B, Kozlowski H, Berthon G (1988) Metal Ion-Tetracycline Interactions in Biological-Fluids .9. Circular-Dichroism Spectra of Calcium and Magnesium Complexes with Tetracycline, Oxytetracycline, Doxycycline, and Chlortetracycline and Discussion of Their Binding Modes. *Inorganic Chemistry* 27 (17):3001-3012 doi:Doi 10.1021/Ic00290a022
51. Wessels JM, Ford WE, Szymczak W, Schneider S (1998) The complexation of tetracycline and anhydrotetracycline with Mg²⁺ and Ca²⁺: A spectroscopic study. *Journal of Physical Chemistry B* 102 (46):9323-9331 doi:Doi 10.1021/Jp9824050
52. Landwirtschaftskammer Schleswig-Holstein, Organische Düngung, Nährstoffgehalte organischer Dünger; online verfügbar unter <https://www.lksh.de/landwirtschaft/pflanze/duengung/organische-duengung/> (zuletzt geprüft am 17. August 2018).
53. McCormick JRD, Fox SM, Smith LL, Bitler BA, Reichenthal J, Origoni VE, Muller WH, Winterbottom R, Doerschuk AP (1957) Studies of the Reversible Epimerization Occurring in the Tetracycline Family - the Preparation, Properties and Proof of Structure of Some 4-Epi-Tetracyclines. *Journal of the American Chemical Society* 79 (11):2848-2858
54. Shang Z, Salim AA, Khalil Z, Bernhardt PV, Capon RJ (2016) Fungal Biotransformation of Tetracycline Antibiotics. *Journal of Organic Chemistry* 81 (15):6186-6194 doi:10.1021/acs.joc.6b01272
55. Blackwood RK, English AR (1970) Structure–Activity Relationships in the Tetracycline Series. In: Perlman D (ed) *Advances in Applied Microbiology*, vol 13. Academic Press, pp 237-266 doi:
56. Nelson ML, Levy SB (2011) The history of the tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1241 (1):17-32 doi:doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06354.x
57. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Amtliche Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (ehemals §35 LMBG), L 01.01-5: Nachweis von Hemmstoffen in Sammelmilch (Agar-Diffusions-Verfahren: Brillantschwarz-Reduktionstest). Veröffentlicht im Februar 1996, Beuth-Verlag, Berlin.
58. Lamshöft M, Sukul P, Zühlke S, Spittler M (2010) Behaviour of C-14-sulfadiazine and C-14-difloxacin during manure storage. *Science of the Total Environment* 408 (7):1563-1568 doi:DOI 10.1016/j.scitotenv.2009.12.010
59. Spielmeier A, Breier B, Groissmeier K, Hamscher G (2015) Elimination patterns of worldwide used sulfonamides and tetracyclines during anaerobic fermentation. *Bioresource Technology* 193:307-314 doi:10.1016/j.biortech.2015.06.081
60. Kahle M, Stamm C (2007) Sorption of the veterinary antimicrobial sulfathiazole to organic materials of different origin. *Environmental Science & Technology* 41 (1):132-138 doi:10.1021/es061198b

61. Wallace JS, Aga DS (2016) Enhancing Extraction and Detection of Veterinary Antibiotics in Solid and Liquid Fractions of Manure. *Journal of Environmental Quality* 45 (2):471-479 doi:10.2134/jeq2015.05.0246
62. Sukul P, Lamshöft M, Zühlke S, Spittler M (2008) Sorption and desorption of sulfadiazine in soil and soil-manure systems. *Chemosphere* 73 (8):1344-1350 doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.066
63. Kahle M, Stamm C (2007) Time and pH-dependent sorption of the veterinary antimicrobial sulfathiazole to clay minerals and ferrihydrite. *Chemosphere* 68 (7):1224-1231 doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.01.061
64. Pignatello JJ, Xing B (1996) Mechanisms of Slow Sorption of Organic Chemicals to Natural Particles. *Environmental Science & Technology* 30 (1):1-11 doi:10.1021/es940683g
65. Hamscher G, Pawelzick HT, 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 doi:http://dx.doi.org/10.1897/04-182r.1
66. Förster M, Laabs V, Lamshöft M, Putz T, Amelung W (2008) Analysis of aged sulfadiazine residues in soils using microwave extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (3):1029-1038 doi:http://dx.doi.org/10.1007/s00216-008-2081-1
67. Giera DD, Abdulla RF, Occolowitz JL, Dorman DE, Mertz JL, Sieck RF (1982) Isolation and Identification of a Polar Sulfamethazine Metabolite from Swine Tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30 (2):260-263 doi:Doi 10.1021/Jf00110a011
68. Rodríguez-Rodríguez CE, Jesús García-Galán M, Blánquez P, Díaz-Cruz MS, Barceló D, Caminal G, Vicent T (2012) Continuous degradation of a mixture of sulfonamides by *Trametes versicolor* and identification of metabolites from sulfapyridine and sulfathiazole. *Journal of Hazardous Materials* 213-214:347-354 doi:https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.02.008
69. Smit LA, Haagsma N, Ruiter A (1999) Binding of sulphadimidine to glucose in sausage. *European Food Research and Technology* 209 (3):201-204 doi:10.1007/s002170050480
70. Welte E (1952) Über die Entstehung von Huminsäuren und Wege ihrer Reindarstellung. *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde* 56 (1-3):105-139 doi:doi:10.1002/jpln.19520560119
71. Gao J, Pedersen JA (2010) Sorption of Sulfonamide Antimicrobial Agents to Humic Acid-Clay Complexes. *Journal of Environmental Quality* 39 (1):228-235 doi:10.2134/jeq2008.0274
72. Lian F, Sun B, Chen X, Zhu L, Liu Z, Xing B (2015) Effect of humic acid (HA) on sulfonamide sorption by biochars. *Environmental Pollution* 204:306-312 doi:https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.05.030
73. Flaig W, Schobinger U, Deuel H (1959) Umwandlung von Lignin in Huminsäuren bei der Verrottung von Weizenstroh. *Chemische Berichte* 92 (8):1973-1982 doi:doi:10.1002/cber.19590920834
74. Maszkowska J, Bialk-Bielinska A, Mioduszezowska K, Wagil M, Kumirska J, Stepnowski P (2015) Sorption of sulfisoxazole onto soil-an insight into different influencing factors. *Environmental Science and Pollution Research* 22 (16):12182-12189 doi:10.1007/s11356-015-4445-3
75. Hu F, Ragauskas A (2012) Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry. *Bioenergy Research* 5 (4):1043-1066 doi:10.1007/s12155-012-9208-0
76. Dong DX, Sun J, Huang FY, Gao Q, Wang Y, Li RX (2009) Using trifluoroacetic acid to pretreat lignocellulosic biomass. *Biomass & Bioenergy* 33 (12):1719-1723 doi:10.1016/j.biombioe.2009.07.013

77. Filya I (2004) Nutritive value and aerobic stability of whole crop maize silage harvested at four stages of maturity. *Animal Feed Science and Technology* 116 (1):141-150 doi:<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.06.003>
78. Pirmohammadi R, Rouzbehan Y, Rezayazdi K, Zahedifar M (2006) Chemical composition, digestibility and in situ degradability of dried and ensiled apple pomace and maize silage. *Small Ruminant Research* 66 (1):150-155 doi:<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.054>
79. Belitz H-D, Grosch W, Schieberle P (2008) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 6. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg, doi:
80. Chen WR, Huang CH (2009) Transformation of Tetracyclines Mediated by Mn(II) and Cu(II) Ions in the Presence of Oxygen. *Environmental Science & Technology* 43 (2):401-407 doi:10.1021/es802295r
81. Nouws JFM, Vree TB, Hekster YA (1985) In vitro Antimicrobial Activity of Hydroxy and N-4-Acetyl Sulfonamide Metabolites. *Veterinary Quarterly* 7 (1):70-72
82. Lamshöft M, Sukul P, Zühlke S, Spiteller M (2007) Metabolism of C-14-labelled and non-labelled sulfadiazine after administration to pigs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (8):1733-1745 doi:<https://doi.org/10.1007/s00216-007-1368-y>
83. 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 & Biochemistry* 40 (7):1892-1900 doi:10.1016/j.soilbio.2008.03.014
84. Garcia-Galan MJ, Diaz-Cruz MS, Barcelo D (2008) Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 27 (11):1008-1022 doi:DOI 10.1016/j.trac.2008.10.001
85. Bialk HM, Simpson AJ, Pedersen JA (2005) Cross-coupling of sulfonamide antimicrobial agents with model humic constituents. *Environmental Science & Technology* 39 (12):4463-4473 doi:Doi 10.1021/Es0500916
86. Hay AS (1962) Polymerization by oxidative coupling. II. Oxidation of 2,6-disubstituted phenols. *Journal of Polymer Science* 58 (166):581-591 doi:doi:10.1002/pol.1962.1205816634
87. Thorn KA, Pettigrew PJ, Goldenberg WS, Weber EJ (1996) Covalent Binding of Aniline to Humic Substances. 2. ¹⁵N NMR Studies of Nucleophilic Addition Reactions. *Environmental Science & Technology* 30 (9):2764-2775 doi:10.1021/es9509339
88. Gulkowska A, Sander M, Hollender J, Krauss M (2013) Covalent Binding of Sulfamethazine to Natural and Synthetic Humic Acids: Assessing Laccase Catalysis and Covalent Bond Stability. *Environmental Science & Technology* 47 (13):6916-6924 doi:10.1021/es3044592
89. Eichhorn P, Aga DS (2004) Identification of a photooxygenation product of chlortetracycline in hog lagoons using LC/ESI-ion trap-MS and LC/ESI-time-of-flight-MS. *Analytical Chemistry* 76 (20):6002-6011 doi:Doi 10.1021/Ac0494127
90. Zhang H, Zhou Y, Huang Y, Wu L, Liu X, Luo Y (2016) Residues and risks of veterinary antibiotics in protected vegetable soils following application of different manures. *Chemosphere* 152 (Supplement C):229-237 doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.111>
91. Garcia-Galan MJ, Diaz-Cruz MS, Barcelo D (2010) Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS). *Talanta* 81 (1-2):355-366 doi:DOI 10.1016/j.talanta.2009.12.009
92. Hu XG, Zhou QX, Luo Y (2010) Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases,

- northern China. Environmental Pollution 158 (9):2992-2998 doi:DOI 10.1016/j.envpol.2010.05.023
93. Kivits T, Broers HP, Beeltje H, van Vliet M, Griffioen J (2018) Presence and fate of veterinary antibiotics in age-dated groundwater in areas with intensive livestock farming. Environmental Pollution 241:988-998 doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.085>
94. Tong L, Huang S, Wang Y, Liu H, Li M (2014) Occurrence of antibiotics in the aquatic environment of Jiangnan Plain, central China. Science of the Total Environment 497 (Supplement C):180-187 doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.068>