

# **Abschlussbericht**

zu dem aus Haushaltsmitteln des BMWi über die



*Ideen eine Zukunft geben*

geförderten Forschungsvorhaben

**Nr. 185 Z**

## **Entwicklung eines mikrobiellen Schnelltests zur Identifizierung von Hemmstoffen bei anaeroben Gärprozessen**

### **Forschungsstellen:**

- 1.) Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. (IUTA)  
Bliersheimer Str. 60  
47229 Duisburg
- 2.) Fraunhofer Institut für Umwelt-, Sicherheits- und Energietechnik UMSICHT  
Osterfelder Str. 3  
46047 Oberhausen
- 3.) Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (TiHo)  
Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik  
Bischofsholer Damm 15  
30173 Hannover

### **Projektleitung:**

Dr. Jochen Türk (IUTA)

### **Berichtserstellung und Wissenschaftliche Bearbeitung:**

Dipl.-Ing. Hanna Vitz (IUTA),  
Dipl.-Ing. Ina Strzysch (IUTA),  
Dr. Thekla Kiffmeyer (IUTA),  
Dr. Jochen Türk (IUTA),  
Dipl.-Ing. Bettina Sayder (Fraunhofer UMSICHT),  
Dr. Ute Merrettig-Bruns (Fraunhofer UMSICHT),  
Dr.-Ing. Stephan Kabasci (Fraunhofer UMSICHT),  
M.Sc. Dipl.-Ing. Siegrun Mohring (TiHo),  
Prof. Dr. Gerd Hamscher (TiHo),  
und weitere Mitarbeiter der beteiligten Forschungsstellen.

Duisburg,

Ort, Datum

---

Unterschrift des Leiters und Stempelabdruck  
der Forschungsstelle

---

Oberhausen,

Ort, Datum

---

Unterschrift des Leiters und Stempelabdruck  
der Forschungsstelle

---

Hannover,

Ort, Datum

---

Unterschrift des Leiters und Stempelabdruck  
der Forschungsstelle

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Forschungsthema</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung</b>	<b>14</b>
3.1	Einleitung	14
3.2	Erzeugung und Nutzung von Biogas	14
3.3	Vorkommen von Hemmstoffen in Wirtschaftsdüngern	16
3.3.1	Vorkommen von Schwermetallen	17
3.3.2	Vorkommen von Antibiotika	17
3.3.3	Vorkommen von Desinfektionsmittel	19
3.4	Wirkung verschiedener Hemmstoffe auf die Biogasbildung	20
3.4.1	Hemmwirkung von Schwermetallen	20
3.4.2	Hemmwirkung von Antibiotika	20
3.4.3	Hemmwirkung von Desinfektionsmitteln	22
3.5	Mikrobielle Hemmtests	22
3.5.1	Tests zur Empfindlichkeitsbestimmung	22
3.5.2	Schnelltests	25
3.6	Forschungsziel	28
3.6.1	Angestrebte Forschungsergebnisse	28
3.6.2	Innovativer Beitrag der angestrebten Forschungsergebnisse	28
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>30</b>
4.1	Aufbau der Analysemethoden	30
4.1.1	Sulfonamide	30
4.1.2	Tetracycline	37
4.1.3	Quartäre Ammoniumverbindungen	41
4.1.4	Triclosan	43
4.2	Bestimmung des Trockenrückstands (TR)	44
4.3	Testorganismen und Anzucht	45
4.3.1	<i>Bacillus subtilis</i>	45
4.3.2	<i>Clostridium thermobutyricum</i>	45
4.3.3	Keimzahlbestimmung	47
4.4	Agardiffusionstests	48
4.5	Gärtests	49
4.5.1	Gärtests mit Eudiometer	50
4.5.2	Gärtests im 5-L-Fermenter	51
4.6	Brillantschwarzreduktionstest	51
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
5.1	Auswahl der Hemmstoffe	53
5.2	Ergebnisse des Ringversuches – Vergleich der Methoden für die Analytik von Sulfonamiden und Tetracyclinen	54
5.3	Stabilität von Antibiotika in Gülle	59
5.4	Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Hemmstoffen mittels Gärtests	65
5.4.1	Hemmwirkung von Amoxicillin	65
5.4.2	Hemmwirkung von Chlortetracyclin (CTC)	66
5.4.3	Hemmwirkung von Tetracyclin (TC)	67
5.4.4	Hemmwirkung von Oxytetracyclin (OTC)	67
5.4.5	Hemmwirkung von Sulfadiazin (SDZ) und Trimethoprim (TMP)	68
5.4.6	Hemmwirkung von Sulfamethazin (SMZ) und Trimethoprim (TMP)	69
5.4.7	Hemmwirkung der Kombination SDZ + SMZ + TMP	69

5.4.8	Hemmwirkung von Kupfersulfat (CuSO <sub>4</sub> )	70
5.4.9	Hemmwirkung von quartären Ammoniumverbindungen	71
5.4.10	Hemmwirkung von Triclosan (TCL)	72
5.4.11	Zusammenfassung – Hemmwirkung der verschiedenen Hemmstoffe	74
5.5	Eliminations- / Abbauverhalten und Abbauprodukte	76
5.5.1	Abbauverhalten Tetracycline	76
5.5.2	Abbauverhalten Sulfonamide und Trimethoprim	79
5.5.3	Identifizierung von Metaboliten	84
5.6	Auswahl des anaeroben Testorganismus	86
5.7	Untersuchung der Hemmwirkung mittels Agardiffusionstests	87
5.7.1	Aerobe Agardiffusionstests mit <i>Bacillus subtilis</i>	87
5.7.2	Anaerobe Agardiffusionstests mit <i>Clostridium thermobutyricum</i>	90
5.8	Konstruktion und Erprobung des Hemmstofftests	91
5.8.1	Herstellung der Teströhrchen	92
5.8.2	Durchführung der Hemmstofftests mit den Teströhrchen	93
5.9	Versuchsergebnisse der Hemmtests mit wässrigen Antibiotikallösungen	94
5.9.1	Chlortetracyclin in wässriger Lösung	94
5.9.2	Tetracyclin in wässriger Lösung	95
5.9.3	Sulfadiazin + Trimethoprim in wässriger Lösung	96
5.9.4	Zusammenfassung – Hemmtests mit wässrigen Antibiotikallösungen	98
5.10	Versuchsergebnisse der Hemmtests mit antibiotikadotierter Gülle	99
5.10.1	CTC-haltige Gülle	99
5.10.2	TC-haltige Gülle	100
5.10.3	SDZ-haltige Gülle	100
5.10.4	SMZ-haltige Gülle	101
5.10.5	SDZ- und SMZ-haltige Gülle	102
5.10.6	Zusammenfassung – Hemmtests mit antibiotikadotierter Gülle	102
5.11	Standardisierte Arbeitsanweisung für die Durchführung des Hemmstofftests	105
5.12	Vergleich mit einem Brillantschwarzreduktionstest	105
<b>6</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b>	<b>109</b>
6.1	Stabilitätsversuche	109
6.2	Dosis-Wirkungs-Beziehung	109
6.3	Eliminations- / Abbauverhalten und Bildung von Metaboliten	111
6.4	Entwicklung des Hemmstofftests	112
6.4.1	Optimierung des Herstellungsverfahrens der Teströhrchen	112
6.4.2	Anwendung des Hemmstofftests mit wässrigen Antibiotikallösungen und antibiotikadotierter Gülle	114
6.4.3	Vergleich der Ergebnisse von Gärtest und Hemmstofftest	115
6.4.4	Annahmen zur Vergleichbarkeit von Gärtest und Hemmstofftest	116
6.5	Ausblick	116
<b>7</b>	<b>Wirtschaftliche Bedeutung des Forschungsthemas für kleine und mittlere Unternehmen (kmU)</b>	<b>117</b>
7.1	Voraussichtliche Nutzung der Forschungsergebnisse	117
7.2	Möglicher Beitrag zur Steigerung der Leistungs- und Wettbewerbsfähigkeit der kmU	118
7.3	Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft	118
7.3.1	Verwertungsplan aus dem Antrag	118
7.3.2	Projektbegleitende Ergänzungen	119
<b>8</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>121</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>123</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Grafischer Vergleich der Schwellenwerte von Gärtest und Hemmstofftest	13
Abbildung 3.1:	Substratbeispiele, nach Stoffgruppen sortiert [6]	15
Abbildung 3.2:	Resultat der in-vitro Empfindlichkeitsprüfung eines Erregers mittels Bouillon-Makrodilutionsverfahren [31]	24
Abbildung 3.3:	Ergebnis eines Bouillon-Mikrodilutionstests [31]	24
Abbildung 4.1:	HPLC-Ion Trap-MS Chromatogramme für die Trennung von 7 Sulfonamiden, 3 N <sup>4</sup> acetylierten Sulfonamiden und TMP in Gülle. A: Gülleprobe gespiked mit 1000 µg/kg TMP, AC-SDZ, AC-SMR und AC-SMZ. B: Gülleprobe gespiked mit 1000 µg/kg SDZ, STZ, SMR, SMZ, SMPD, SMX und SDM	32
Abbildung 4.2:	HPLC-ACPI-MS/MS (Triple-Quadrupol) Chromatogramm (TIC) für die Trennung von 5 Sulfonamiden, 3 N <sup>4</sup> acetylierten Sulfonamiden und TMP in Gülle (100 µg/kg gespiked), 1: TMP, 2: SDZ, 3: STZ, 4: Ac-SDZ, 5: SMR, 6: Ac-SMR, 7: Ac-SMZ, 8: SMDP, 9: SMZ, 10: SMX	35
Abbildung 4.3:	HT-HPLC-ESI-MS/MS Chromatogramm für die Trennung von 5 Sulfonamiden, 3 N <sup>4</sup> acetylierten Sulfonamiden und TMP in Gülle (100 µg/kg gespiked); 1: TMP, 2: SDZ, 3: STZ, 4: Ac-SDZ, 5: SMR, 6: Ac-SMR, 7: Ac-SMZ, 8: SMDP, 9: SMZ, 10: SMX, A: unbekannte Störkomponente	36
Abbildung 4.4:	Chromatogramm und MS/MS-Spektren Chlortetracycline	38
Abbildung 4.5:	HPLC-ESI-MS/MS Chromatogramm einer aufgestockten Gülleprobe mit je 0,1 mg/kg pro Substanz 1: Epi-TC, 2: OTC, 3: TC, 4: Iso-CTC, 5: Epi-CTC, 6: CTC, 7: Epi-ATC, 8: ATC (TR Gülle: 5,5 %)	40
Abbildung 4.6:	Beispielchromatogramm quartäre Ammoniumverbindungen in einer aufbereiteten Gülleprobe mit einer Konzentration von jeweils 25 mg/kg (TR: 8 %) 1: BAB-C12, 2: BAC-C14, 3: BAC-C16	42
Abbildung 4.7:	GC/MS Chromatogramm (TIC) in einer aufgearbeiteten Gülleprobe mit 50 mg TCL/kg, 1: TCL, 2: Bisphenol-a D16 (TR Gülle: 4,8 %)	44
Abbildung 4.8:	Schematische Darstellung des Spatelplattenverfahrens [48]	47
Abbildung 4.9:	Schematische Darstellung zum Agardiffusionstest	48
Abbildung 4.10:	Schematischer Aufbau eines Gärtestansatzes	49
Abbildung 4.11:	500 mL Gefäße mit Eudiometern (links: UMSICHT, rechts: IUTA)	50
Abbildung 4.12:	5 Liter Fermenter mit Milligascountern und Methan-Sensoren (IUTA)	51
Abbildung 4.13:	Foto eines BRTs (1. Positiv-Kontrolle (vierfach Ansatz), 2. Negativ-Kontrolle (vierfach Ansatz), 3. Positive Proben, 4. Verdächtige Probe	52
Abbildung 5.1:	Stabilität von Chlortetracyclin in verschiedenen Güllen (Gülle 2: keine Messung Nov. 2007)	61
Abbildung 5.2:	Stabilität von Tetracyclin in verschiedenen Güllen (Gülle 2: keine Messung Nov. 2007)	62
Abbildung 5.3:	Stabilität von Sulfadiazin in verschiedenen Güllen (Gülle 2: keine Messung Nov. 2007, Gülle 2, 6 u. 7: keine 1. Messung)	62
Abbildung 5.4:	Stabilität von Sulfamethazin in verschiedenen Güllen (Gülle 2: keine Messung Nov. 2007, Gülle 2, 6 u. 7: keine 1. Messung)	63
Abbildung 5.5:	Stabilität von Sulfonamiden, einem acetylierten Sulfonamid und TMP in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur (4° C und 25° C)	64

Abbildung 5.6:	Gasbildung von verschiedenen Amoxicillin-Konzentrationen (Gärtests mit Eudiometer)	66
Abbildung 5.7:	Hemmwirkung von verschiedenen CTC-Konzentrationen (Gärtests mit Eudiometer)	66
Abbildung 5.8:	Hemmwirkung von verschiedenen TC-Konzentrationen (Gärtests mit Eudiometer)	67
Abbildung 5.9:	Hemmwirkung von verschiedenen OTC-Konzentrationen (Gärtests mit Eudiometer)	68
Abbildung 5.10:	Hemmwirkung von verschiedenen SDZ-Konzentrationen (Gärtests mit Eudiometer)	68
Abbildung 5.11:	Hemmwirkung von verschiedenen SMZ-Konzentrationen (Gärtests mit Eudiometer)	69
Abbildung 5.12:	Hemmwirkung von verschiedenen SDZ+SMZ-Konzentrationen (Gärtests mit Eudiometer)	70
Abbildung 5.13:	Hemmwirkung von verschiedenen CuSO <sub>4</sub> -Konzentrationen (Gärtests mit Eudiometer)	71
Abbildung 5.14:	Hemmwirkung von verschiedenen Konzentrationen von quartären Ammoniumverbindungen (Gärtests mit Eudiometer)	72
Abbildung 5.15:	Hemmwirkung von verschiedenen TCL-Konzentrationen (Gärtests mit Eudiometer)	73
Abbildung 5.16:	Hemmwirkung von Triclosan (100 mg/kg), Gasvolumen und Methankonzentration, 5-L-Fermenter	74
Abbildung 5.17:	Gemessene Konzentrationen CTC und Iso-CTC vor und nach Versuchsende, Gärtest mit Eudiometer (TR Gülle: 8,3 %)	77
Abbildung 5.18:	Korrelation Menge zudotierter Substanz und gemessene Konzentration	77
Abbildung 5.19:	Gemessene Konzentrationen SDZ, SMZ und TMP vor und nach Versuchsende, Gärtests mit Eudiometer (TR Gülle: 8,3 %)	80
Abbildung 5.20:	Konzentrationsverläufe von SDZ (750 mg/kg) und TMP (150 mg/kg), 5-L-Fermenter	81
Abbildung 5.21:	Konzentrationsverläufe von SDZ (278 mg/kg), Ac-SDZ und TMP (56 mg/kg), 5-L-Fermenter	82
Abbildung 5.22:	Konzentrationsverläufe von SDZ (500 mg/kg), Ac-SDZ, SMZ (500 mg/kg), Ac-SMZ und TMP (100 mg/kg), 5-L-Fermenter	83
Abbildung 5.23:	Konzentrationsverläufe von sieben Sulfonamiden (jew. 2 mg/kg), 5-L-Fermenter	84
Abbildung 5.24:	Foto BRT (Hemmwirkung des Metaboliten)	85
Abbildung 5.25:	MS-MS Spektrum SDZ-Metabolit (TiHo)	86
Abbildung 5.26:	MS <sup>3</sup> -Spektrum SDZ-Metabolit, Fragmentierung des m/z 112-Fragments (TiHo)	86
Abbildung 5.27:	Foto der Hemmhofausbildung für <i>Bacillus subtilis</i>	88
Abbildung 5.28:	Konzentrationsabhängigkeit der Hemmwirkung von SDZ und TMP (pH 7,2) mit <i>Bacillus subtilis</i>	88
Abbildung 5.29:	Konzentrationsabhängigkeit der Hemmwirkung von Amoxicillin (pH 5) mit <i>Bacillus subtilis</i>	89
Abbildung 5.30:	pH-Wert-Abhängigkeit der Hemmwirkung von Amoxicillin (links) und Penicillin G (rechts) bei verschiedenen Konzentrationen mit <i>Bacillus subtilis</i>	89
Abbildung 5.31:	Foto der Hemmhofausbildung für <i>Clostridium thermobutyricum</i>	90

Abbildung 5.32:	Konzentrationsabhängigkeit der Hemmwirkung von CTC und SDZ mit <i>Clostridium thermobutyricum</i>	91
Abbildung 5.33:	Möglicher Aufbau des Hemmstofftests	92
Abbildung 5.34:	Nicht inkubiertes Teströhrchen bei RT	92
Abbildung 5.35:	Teströhrchen nach einer Inkubationszeit von 7,5 h	93
Abbildung 5.36:	Beispiel eines Hemmstofftests	93
Abbildung 5.37:	Foto der Versuchsauswertung für 400 mg SDZ/L (Agarmenge: 2 mL)	97
Abbildung 5.38:	Foto der Versuchsauswertung für 500 mg SDZ+SMZ/kg (Agarmenge: 2 mL)	102
Abbildung 5.39:	Referenzteströhrchen ohne <i>C. thermobutyricum</i> nach Überschichtung mit undotierter Gülle	104

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Schwellenwertbereiche und Hemmung der Biogasproduktion der in diesem Forschungsvorhaben untersuchten Hemmstoffe	12
Tabelle 3.1:	Schwermetallgehalte von Wirtschaftsdüngern [6]	17
Tabelle 3.2:	Beschriebene Maximalkonzentrationen für Antibiotika in Gülle (Auswahl der für das Forschungsvorhaben relevanten Substanzen)	18
Tabelle 4.1:	HPLC-Gradient: Sulfonamide (TiHo)	31
Tabelle 4.2:	Messparameter: Sulfonamide, Acetylierte Sulfonamide, Trimethoprim (TiHo)	31
Tabelle 4.3:	Validierungsparameter: Sulfonamide in Gülle	32
Tabelle 4.4:	Validierungsparameter: Sulfonamide in Gärsubstrat	33
Tabelle 4.5:	HPLC Gradient für HPLC-ACPI-MS/MS Methode, IUTA	34
Tabelle 4.6:	MS/MS-Einstellungen zur Messung der Sulfonamide am IUTA (HPLC-ACPI-MS/MS)	34
Tabelle 4.7:	Validierungsparameter für die HPLC-ACPI-MS/MS (Triple Quadrupol) Methode (IUTA)	35
Tabelle 4.8:	Temperatur- und Lösemittelgradient für die HT-HPLC-ESI-MS/MS Methode (IUTA)	36
Tabelle 4.9:	Messparameter Tetracycline (TiHo)	37
Tabelle 4.10:	HPLC-Gradient: Tetracycline (TiHo)	38
Tabelle 4.11:	Validierungsparameter: Tetracycline in Gärsubstrat (TiHo)	39
Tabelle 4.12:	Lösemittelgradient für die Analytik der Tetracycline, IUTA	39
Tabelle 4.13:	MS Parameter für die Analytik der Tetracycline (IUTA)	40
Tabelle 4.14:	Wiederfindungsraten Tetracycline (IUTA)	41
Tabelle 4.15:	HPLC-Gradient zur Bestimmung von quartären Ammoniumverbindungen	41
Tabelle 4.16:	MS Einstellungen für die Analytik von quartären Ammoniumverbindungen (IUTA)	42
Tabelle 4.17:	Validierungsparameter quartäre Ammoniumverbindungen (IUTA)	42
Tabelle 4.18:	Validierungsparameter Triclosan (IUTA)	44
Tabelle 4.19:	Zusammensetzung des Reinforced Clostridia Mediums	46
Tabelle 4.20:	Zusammensetzung des Sporulationsmediums nach Haggström und Molin [47]	46
Tabelle 4.21:	Zusammensetzung der Spurenelementlösung für das Sporulationsmedium	47
Tabelle 4.22:	Zusammensetzung des Fleischpepton-Agars	48
Tabelle 5.1:	Nachweisgrenzen der Methoden im Ringversuch	55
Tabelle 5.2:	Ergebnisse des Ringversuches für Sulfadiazin	56
Tabelle 5.3:	Ergebnisse des Ringversuches für Sulfamethazin	56
Tabelle 5.4:	Ergebnisse des Ringversuches für Tetracycline	57
Tabelle 5.5:	Ergebnisse des Ringversuches für Chlortetracyclin	57
Tabelle 5.6:	Ergebnisse des Ringversuches für Oxytetracyclin	58
Tabelle 5.7:	Untersuchung zur Langzeit-Stabilität von Tetracyclinen und Sulfonamiden in verschiedenen Güllen (Lagerung im Dunkeln in verschlossenen PE-Flaschen bei 4 °C).	60



Tabelle 5.8:	Untersuchung zur Langzeit-Stabilität von Tetracyclinen und Sulfonamiden in einer dotierten Schweinegülle (Lagerung im Dunkeln in verschlossenen PE-Flaschen bei 4°C)	61
Tabelle 5.9:	Zusammenfassung der Hemmwirkung in den Gärtests	75
Tabelle 5.10:	Gemessene Konzentrationen CTC und Iso-CTC (Proben nach Versuchsende)	76
Tabelle 5.11:	Gemessene Konzentrationen CTC und Iso-CTC (Proben nach Versuchsende)	78
Tabelle 5.12:	Gemessene Konzentrationen TC (Proben nach Versuchsende)	78
Tabelle 5.13:	Gemessene Konzentrationen Sulfonamide nach Versuchsende, Gärtests mit Eudiometer	79
Tabelle 5.14:	Gemessene Konzentrationen SDZ und SMZ nach Versuchsende, Gärtests mit Eudiometer	80
Tabelle 5.15:	Gemessene Konzentrationen SDZ, SMZ und SDZ + SMZ nach Versuchsende, Gärtests mit Eudiometer	81
Tabelle 5.16:	Ergebnisse der Hemmtests mit wässriger CTC-Lösung	95
Tabelle 5.17:	Ergebnisse der Hemmtests mit wässriger TC-Lösung	96
Tabelle 5.18:	Ergebnisse der Hemmtests mit wässrigen Lösungen von SDZ + TMP	98
Tabelle 5.19:	Zusammenfassung der Hemmtests mit wässrigen Antibiotikalösungen	99
Tabelle 5.20:	Ergebnisse der Hemmtests mit CTC-haltiger Gülle	100
Tabelle 5.21:	Ergebnisse der Hemmtests mit TC-haltiger Gülle	100
Tabelle 5.22:	Ergebnisse der Hemmtests mit SDZ-haltiger Gülle	101
Tabelle 5.23:	Ergebnisse der Hemmtests mit SMZ-haltiger Gülle	101
Tabelle 5.24:	Ergebnisse der Hemmtests mit SDZ- und SMZ-haltiger Gülle	102
Tabelle 5.25:	Zusammenfassung der Hemmtests mit antibiotikadotierter Gülle	103
Tabelle 5.26:	Hemmwirkung von dotierter Gülle (BRT ohne Vordiffusion)	106
Tabelle 5.27:	Hemmwirkung von wässrigen Antibiotikalösungen (BRT mit Vordiffusion)	107
Tabelle 5.28:	Hemmwirkung der Gülleproben aus dem Ringversuch (BRT ohne Vordiffusion)	108
Tabelle 6.1:	Halbwertszeiten ausgewählter Antibiotika in Gülle	109
Tabelle 6.2:	Vergleich der Schwellenwerte aus Hemmtests mit wässrigen Antibiotikalösungen und Hemmtests mit antibiotikadotierter Gülle	114
Tabelle 6.3:	Vergleich der Schwellenwerte aus Gärtest und Hemmstofftest	115

## Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotikum
AC-SDZ	Acetyl-Sulfadiazin
AC-SMR	Acetyl-Sulfamerazin
AC-SMZ	Acetyl-Sulfamethazin
ATC	Anhydroxytetracyclin
BAB-C12	Benzyl-dodecyldimethyl-ammoniumbromid
BAC-C14	Benzyl-tetradecyldimethyl-ammoniumchlorid
BAC-C16	Benzyl-hexadecyldimethyl-ammoniumchlorid
CAST	Calf antibiotic and sulfa test
CTC	Chlortetracyclin
DPT	Dreiplattentest
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DXC	Doxycyclin
EEG	Erneuerbare-Energien-Gesetz
EWZ	Einwirkzeit
FID	Flammenionisationsdetektor
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
KBE	Koloniebildende Einheiten
NawaRo	Nachwachsende Rohstoffe
NWG	Nachweisgrenze
OTC	Oxytetracyclin
QAV	Quartäre Ammoniumverbindungen
RC-Agar	Reinforced Clostridia Agar
RCM	Reinforced Clostridia Medium
SDM	Sulfadimethoxin
SDZ	Sulfadiazin
SMPD	Sulfamethoxy-pyridazin
SMR	Sulfamerazin
SMX	Sulfamethoxazol
SMZ	Sulfamethazin
STOP	Swab test on premises
STZ	Sulfathiazol
TC	Tetracyclin
TCL	Triclosan
TMP	Trimethoprim
TR	Trockenrückstand
WDF	Wiederfindungsrate
WLD	Wärmeleitfähigkeitsdetektor

# 1 Forschungsthema

## **Entwicklung eines mikrobiellen Schnelltests zur Identifizierung von Hemmstoffen bei anaeroben Gärprozessen**

# 2 Zusammenfassung

Antibiotika, die in landwirtschaftlichen Betrieben zur Behandlung von Tierbeständen ihren Einsatz finden, können in beträchtlichen Mengen in Wirtschaftsdüngern nachgewiesen werden. Wird diese Gülle als Gärsubstrat in einer Biogasanlage eingesetzt, kann es zu einer Beeinträchtigung der Biogasproduktion kommen. Daher ist der Einfluss dieser Wirkstoffe auf den Gärprozess, sowie das Sorptions- und Abbauverhalten während der Biogasproduktion von großem Interesse.

Die Ziele dieses Forschungsvorhabens waren die Erarbeitung von Kriterien zur Beurteilung und Vermeidung der auf hemmstoffhaltige Substrate zurückführenden Betriebsstörungen sowie die Entwicklung eines mikrobiellen Schnelltests zur Identifizierung von Hemmstoffen bei anaeroben Gärprozessen.

Auf der Basis von Vorversuchen, publizierten Stabilitätstests und bekannten Wirkmechanismen wurde eine Auswahl von potenziellen Hemmstoffen für die Durchführung von weitergehenden Untersuchungen getroffen. Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Untersuchung des Verhaltens und der Wirkung von Antibiotika (hauptsächlich Sulfonamide und Tetracycline) sowie Desinfektionsmitteln bei der Biogaserzeugung. Wirkungsuntersuchungen mit den ausgewählten Hemmstoffen sind mit Hilfe von Gärtests im 500-mL- (Standardgärttest) und 5-L-Maßstab (Laborfermenter) durchgeführt worden. Aus diesen Testergebnissen konnte in Abhängigkeit von der Konzentration in der Gülle die Wirkung auf den Gasbildungsprozess in Biogasanlagen abgeschätzt werden (Dosis-Wirkungs-Beziehung). Als Schwellenwert für eine Hemmung wurde die Verminderung der Gasproduktion um 15 % festgelegt. In Tabelle 2.1 sind die für die Biogaserzeugung relevanten Schwellenwertbereiche zusammen mit den festgestellten Hemmungen der Biogasproduktion zusammengefasst. Darüber hinaus ist auf das Vorkommen der bereits in Vorstudien untersuchten, heute allerdings nur noch in geringen Mengen eingesetzten Antibiotika Bacitracin, Lincomycin, Monensin, Spiramycin, Tylosin und Virginiamycin zu achten. Bei den Desinfektionsmitteln ist entsprechend den Literaturangaben auch bei korrekter Dosierung mit Dekaseptol, Durosept, Incidin anticoc sowie Lysococ eine signifikante Hemmung der Biogasproduktion zu erwarten.

Tabelle 2.1: Schwellenwertbereiche und Hemmung der Biogasproduktion der in diesem Forschungsvorhaben untersuchten Hemmstoffe

<b>Wirkstoff</b>	<b>Schwellenwert [mg/kg Gülle]</b>	<b>Hemmung nach 28 Tagen [%]</b>
Chlortetracyclin	125 - 250	10 - 30
Tetracyclin	125 - 250	11 - 29
Oxytetracyclin	200 - 500	0 - 39
Sulfadiazin (+ Trimethoprim)	750 – 1.000	5 - 20
Sulfamethazin (+ Trimethoprim)	150 - 210	0 - 25
Sulfadiazin + Sulfamethazin (+ Trimethoprim)	400 – 1.250	13 - 60
Kupfersulfat	600 – 1.250	6 - 29
Quartäre Ammoniumverbindungen	75 - 150	14 - 18
Triclosan	65 - 100	13 - 36

Zusätzlich zu der Hemmwirkung konnte das Abbauverhalten der Hemmstoffe im Rahmen von Stabilitätstests mit dotierten Gülleproben ermittelt bzw. über die Aufnahme von Konzentrationsverläufen während der Fermentationsversuche bestimmt werden. Bei Sulfadiazin konnte zwar nach dem Ende der Gärtests keine quantitative Bilanz erstellt werden, es war aber möglich, die molekulare Struktur eines bei der anaeroben Fermentation gebildeten Metaboliten mittels Ion Trap und ToF-MS zu bestimmen. Zusätzlich wurde mit Hilfe eines Brillantschwarzreduktionstests eindeutig nachgewiesen, dass dieses Abbauprodukt eine deutlich geringere Hemmwirkung als die Muttersubstanz zeigt. Des Weiteren erwiesen sich die Sulfonamide Sulfamerazin, Sulfamethoxazol und Sulfadimethoxin bei der Fermentation als zumindest vollständig eliminierbar, Abbauprodukte konnten nicht identifiziert werden. Dagegen zeigte sich, dass Sulfamethazin weder allein noch in der Kombination mit Sulfadiazin abbaubar ist.

Auf der Basis eines Agardiffusionstests wurde im Rahmen dieses Vorhabens ein aussagekräftiger, anaerober Hemmstofftest mit dem Testkeim *Clostridium thermobutyricum* entwickelt, der sich zur Untersuchung von Gärsubstraten eignet. Dieser Hemmstofftest macht es möglich, eine qualitative Ja/Nein-Aussage über den Hemmstoffgehalt von Gülle zu treffen. Die Analysenzeit liegt mit 7,5 Stunden deutlich unterhalb der Zeit, die die Durchführung eines Standardgärtests nach DIN 38414 in Anspruch nehmen würde (zwei bis vier Wochen).

Beim in Abbildung 2.1 dargestellten Vergleich der mittels Gärtest bestimmten Schwellenwerte mit dem Hemmstofftest stellte sich für Chlortetracyclin und Tetracyclin heraus, dass die Schwellenwerte des Hemmstofftests niedriger lagen als die der Gärtests. Sulfadiazin und Sulfamethazin riefen im Hemmstofftest innerhalb der durch die Gärtests vorgegebenen Bereiche eine Hemmung hervor. Im Falle der Kombination der beiden Sulfonamide, reagierte

der Hemmstofftest mit einem Schwellenwert unterhalb von 300 mg/kg geringfügig zu empfindlich.

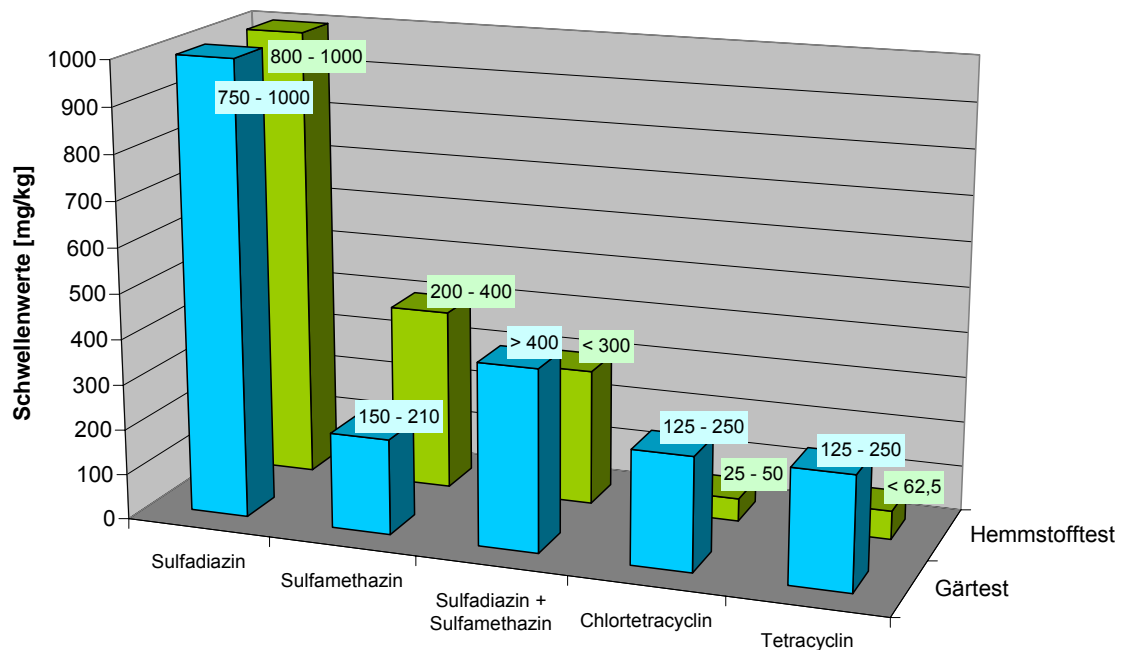


Abbildung 2.1: Grafischer Vergleich der Schwellenwerte von Gärtest und Hemmstofftest

Kupfersulfat, Triclosan und die drei ausgewählten quartären Ammoniumverbindungen verursachten die Hemmung der Gasproduktion in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen. Während Kupfersulfat erst in einem Bereich von 600 - 1.250 mg/kg hemmend wirkte, wiesen Triclosan und die quartären Ammoniumverbindungen schon ab 65 bzw. 75 mg/kg eine Hemmwirkung auf.

Die Ergebnisse des hier dargestellten Forschungsvorhabens zeigen, dass ein aussagekräftiger anaerober Hemmstofftest zur Überprüfung von Gülle entwickelt werden konnte. Durch die Erhöhung der Sporenkonzentration sollte eine weitere Verkürzung der Inkubationszeit möglich sein. Zur Weiterentwicklung zu einem marktfähigen Produkt müssen im Bereich der Schwellenwerte noch Feineinstellungen und weiterführende Validierungsguntersuchungen durchgeführt werden. Neben der in diesem Forschungsvorhaben gewählten Variante mit Teströhrchen zeigen erste Vergleichsuntersuchungen mit Brillantschwarzreduktionstests, dass auch die Entwicklung eines Testsystems im 96er Plattenformat zur Untersuchung von Gülle prinzipiell geeignet ist. Das Problem der Matrixabtrennung konnte durch die Einführung einer Vordiffusionsschicht in beiden Testvarianten erfolgreich gelöst werden.

**Das Ziel des Forschungsvorhabens wurde erreicht.**

## 3 Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung

### 3.1 Einleitung

Die Aufkommen von Gülle und organischen Reststoffen stellen ein ökologisches und ökonomisches Problem dar. Eine direkte Weiterverwendung dieser Stoffe ist oftmals nicht möglich oder zumindest mit erheblichen Beeinträchtigungen der Umwelt durch z. B. unkontrollierte Methan-, Ammoniak- und Nitratemissionen verbunden.

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die Vergärung von Gülle und organischen Reststoffen in Biogasanlagen einen umweltschonenden und wirtschaftlichen Verwertungsweg darstellt. Neben dem energetisch nutzbaren Biogas kann durch die anaerobe Behandlung aus den Reststoffen ein hochwertiger und hygienisch einwandfreier Pflanzendünger hergestellt werden [1].

Wiederholt wurde jedoch über Störungen beim Betrieb von Biogasanlagen bei der Verwendung vermutlich hemmstoffhaltiger Substrate berichtet. Eine große Bedeutung kommt hierbei vor allem der Hemmwirkung antibiotikahaltiger Gülle zu, die nach Betreiberberichten häufig für das Auftreten von Betriebsstörungen verantwortlich gemacht wird {, 2006 #191}. Gleiches gilt für andere Einsatzstoffe wie z. B. belastete Milch und mit Desinfektions- oder Reinigungsmitteln belastete organische Abfallstoffe.

Betriebsstörungen, die durch den Eintrag hemmstoffhaltiger Substratchargen hervorgerufen werden, sind mit einem deutlichen und lang anhaltenden Rückgang der Biogasbildung verbunden und können beim Anlagenbetreiber zu beträchtlichen Erlösminderungen bis hin zu Verlusten durch den Austausch des ganzen Fermenterinhalt führen.

Ein schnelles Testverfahren, das geeignet ist, die Hemmwirkung von Substratchargen auf den Gärprozess zu ermitteln und dadurch das Risiko des Eintrags dieser Hemmstoffe in die Fermenter zu vermeiden, existiert derzeit nicht.

### 3.2 Erzeugung und Nutzung von Biogas

Der Einsatz von organischen Reststoffen und nachwachsenden Rohstoffen (NawaRo) in Biogasanlagen stellt einen ökonomisch und ökologisch sinnvollen Weg der energetischen Verwertung dieser Materialien dar. In den Biogasanlagen erfolgt eine anaerobe Behandlung von organischem Material. Als Gärsubstrate können beispielsweise Gülle (Kot, Harn und Einstreu von Nutztieren), Abfälle und Nebenprodukte der Lebensmittelindustrie (wie z. B. Brennereischlempe) sowie Pflanzen oder Pflanzenbestandteile (Grünschnitt, Silage) verwendet werden. Bei der Vergärung entsteht ein methanreiches Biogas, welches in Blockheizkraftwerken zur Erzeugung von Strom und Wärme genutzt wird. Die entstehenden Gärreste können als hochwertiger Pflanzendünger weiterverwendet werden. Durch die Rückfüh-

rung der in den Substraten enthaltenen Nährstoffe wie z. B. Phosphat wird ein natürlicher Stoffkreislauf geschlossen.

Art, Qualität, und Menge der eingesetzten Substrate haben einen erheblichen Einfluss auf die Betriebssicherheit und den Leistungsbereich einer Biogasanlage. Die Gasausbeute wird maßgeblich durch die Eigenschaften und die Inhaltsstoffe des eingesetzten Substrates mitbestimmt. Viele Biogasanlagen in Deutschland verwenden als Hauptsubstrat Wirtschaftsdünger (z. B. Rindergülle, Schweinegülle, Festmist, Hühnerkot). In über 80 % der deutschen Biogasanlagen machen Wirtschaftsdünger einen Massenanteil von mindestens 50 % aus. Bei neu errichteten Biogasanlagen ist der Trend zu verzeichnen, den Massenanteil von Ko-Substraten zu erhöhen. Hierzu gehören z. B. Nachwachsende Rohstoffe (NawaRos), Pflanzliche Reststoffe und Tierische Reststoffe. Abbildung 3.1 gibt einen Überblick über die verschiedenen möglichen Substrate.

<b>Stoffgruppe</b>			
<b>(Basissubstrat)</b>	<b>(Ko-)Substrate</b>		
<b>Wirtschaftsdünger</b>	<b>Nachwachsende Rohstoffe</b>	<b>Pflanzliche Reststoffe</b>	<b>Tierische Reststoffe</b>
Rindergülle Schweinegülle Hühnergülle Festmist ...	Silomais Grassilage Rübenblattsilage Getreide- Ganzpflanzensilage ...	Futterreste Ernterückstände Grasschnitt ...	Fette Speisereste Bioabfälle ...

Abbildung 3.1: Substratbeispiele, nach Stoffgruppen sortiert {Fachverband Biogas e. V., 2007 #210}

Der Einsatz der Biogastechnologie wird durch den Gesetzgeber gefördert. Insbesondere durch die Verabschiedung des Erneuerbare-Energien-Gesetzes (EEG), und die damit gesicherten Erlöse für die Netzeinspeisung des aus Biogas erzeugten Stroms, hat sich die Anzahl der landwirtschaftlichen Biogasanlagen in Deutschland in den letzten Jahren auf rund 3.700 erhöht (Stand 09/2007) {K, #0}. Die Grundvergütungen liegen nach dem EEG vom 21.07.2004 für Anlagen, die im Jahr 2008 in Betrieb genommen werden, je nach Anlagengröße zwischen 7,91 und 10,83 ct/kWh. Auch die Förderung über den so genannten NawaRo-Bonus ist für viele Betreiber von Anlagen eine wichtige Grundlage für die Wirtschaftlichkeit. Erfüllen die gesamten Gärsubstrate einer Biogasanlage die Anforderungen um als nachwachsende Rohstoffe eingestuft zu werden (auch Gülle zählt hierzu), erhöhen sich die Grundvergütungen pro Kilowattstunde um bis zu 6 Cent. Wegen der geringen Transportwür-

digkeit von Gülle wurden viele Biogasanlagen in den vergangenen Jahren ausschließlich auf der Basis von Ackerfrüchten (in der Hauptsache Silomais) errichtet und betrieben. Bei der momentanen Novellierung des EEG soll dieser Abkehr der aus ökologischen Gründen gewünschten Vergärung von Gülle durch einen Gülle-Bonus entgegengewirkt werden. Biogasanlagenbetreiber sollen in Zukunft bei einem Einsatz von mindestens 30 % Gülle einen weiteren Bonus erhalten. Es ist somit zu erwarten, dass zukünftig eine größere Nachfrage nach Gülle (welche Hemmstoff-Belastungen aufweisen kann) als Gärsubstrat besteht. Ein Testsystem zur Identifikation von vermeintlich belasteten Substratchargen würde diese Entwicklung unterstützen und erleichtern.

### **3.3 Vorkommen von Hemmstoffen in Wirtschaftsdüngern**

Verfahrenstechnische Störungen in der Biogasanlage können unter anderem durch zu niedrige oder hohe Temperaturen oder durch einen Sauerstoffeintrag, der die methanbildenden Bakterien schädigt, hervorgerufen werden. Auch Hemmstoffe, die zum einen durch die Fermentation selbst gebildet (z. B. Ammoniak oder Schwefelwasserstoff) oder zum anderen durch hemmstoffhaltige Substratchargen eingebracht werden, können negative Auswirkungen auf die Entwicklung und Vermehrung der in der Biogasanlage vorhandenen Mikroorganismen haben und so Betriebsstörungen auslösen. Zu den von außen zugeführten Hemmstoffen zählen unter anderem Desinfektionsmittel, Schwermetalle oder die in der Veterinärmedizin eingesetzten Antibiotika. Betriebsstörungen können in Biogasanlagen mit einem deutlichen und lang anhaltenden Rückgang der Biogasbildung verbunden sein und dem Anlagenbetreiber beträchtlichen wirtschaftlichen Schaden zufügen. Neben dem Produktionsausfall muss mit hohen Kosten für die Reinigung der Anlage sowie für die Entsorgung der belasteten Gärsubstrate gerechnet werden.



### 3.3.1 Vorkommen von Schwermetallen

Schwermetalle können über Futtermittel und Futterzusatzstoffe sowie kupferhaltige Desinfektionsmittel in den Wirtschaftsdünger und damit in die Biogasanlage gelangen {, 2006 #191}. In Tabelle 3.1 sind Schwermetallgehalte für verschiedene Wirtschaftsdünger dargestellt.

Tabelle 3.1: Schwermetallgehalte von Wirtschaftsdüngern {Engels, 2004 #93}

Substrat	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
	[mg/kg TR]						
Rindergülle	0,3	7,3	44,5	0,06	5,9	7,7	270
Schweinegülle	0,4	9,4	309	0,02	10,3	6,2	858
Rindermist	0,29	12,9	39,0	0,03	5,2	30,0	190
Schweinemist	0,33	10,3	450	0,04	9,5	5,1	1068
Hühnermist	0,25	4,4	52,6	0,02	8,1	7,2	336

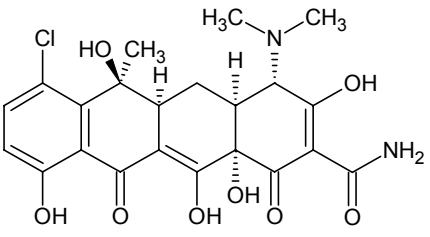
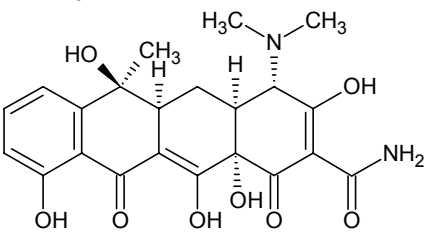
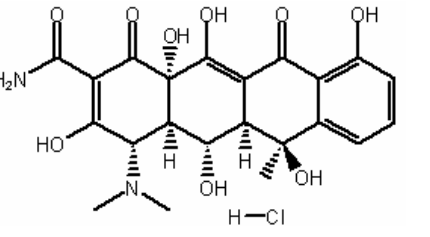
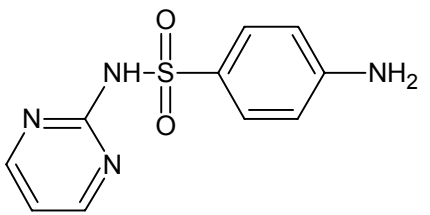
### 3.3.2 Vorkommen von Antibiotika

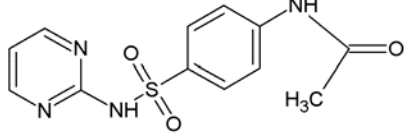
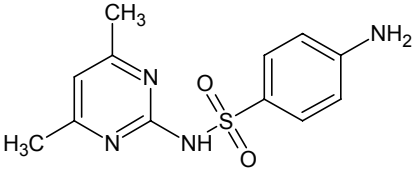
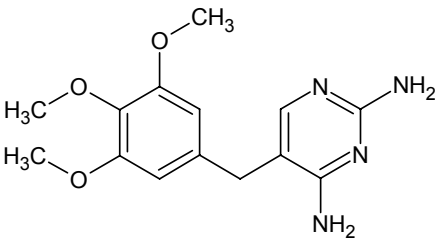
Antibiotika, die in der Veterinärmedizin bei Erkrankungen und zur Prophylaxe eingesetzt werden, gelangen über die Ausscheidungen der Tiere zu einem großen Teil in den Wirtschaftsdünger. Im Rahmen von früheren wissenschaftlichen Untersuchungen zu dem Vorkommen von Antibiotika in Wirtschaftsdüngern wurden vor allem die in der Veterinärmedizin häufig eingesetzten Sulfonamide und Tetracycline betrachtet. Bei Screening-Untersuchungen von Gülle in den Jahren 1999/2000 und 2001/2002 wurden die Konzentrationen der Tetracycline TC, OTC, CTC sowie der Sulfonamide SDZ und SMZ in jeweils etwa 170 anonymen Proben bestimmt. In der ersten Untersuchung 1999/2000 konnten in 35,1 % der Proben keine Antibiotika, in 26,9 % jedoch mindestens ein Antibiotikum nachgewiesen werden. Beim zweiten Screening im Jahr 2001/2002 wurden in 12,5 % der Proben keine Antibiotika analysiert, in 40,3 % der Proben wurde hingegen mindestens ein Antibiotikum nachgewiesen {Langhammer, 1989 #136}.

Berger et al. zeigten, dass 46 % des Schweinen verabreichten Sulfamethazins in die Gülle gelangt, 50 % davon metabolisiert als N<sup>4</sup>-Acetyl-Sulfamethazin. Nach 8-tägiger Medikation von Schweinen mit Sulfamethazin und Sulfathiazol können Rückstände der Substanzen von bis zu 39 mg/l in der Gülle auftreten {Engels, 2004 #172}. Pfeifer et al. sowie Haller et al. wiesen in 50 bis 80 % der untersuchten Gülleproben Sulfonamide und deren Metabolite nach. Christian et al. fanden in allen von ihnen untersuchten Gülleproben Antibiotikarückstände im mg/kg-Bereich.

Tetracycline und Sulfonamide können also nach bestimmungsgemäßer Anwendung Rückstandskonzentrationen im mg/kg-Bereich in der Gülle hinterlassen. In Tabelle 3.2 sind die für dieses Forschungsvorhaben relevanten Antibiotika aufgelistet, die laut Literaturangaben in Gülle gefunden wurden. Die von Kues et al. angegebenen Konzentrationswerte basieren nur auf einzelnen Proben.

Tabelle 3.2: Beschriebene Maximalkonzentrationen für Antibiotika in Gülle (Auswahl der für das Forschungsvorhaben relevanten Substanzen)

Substanz	Maximale Antibiotika-konzentration in Gülle [mg/kg]	Referenz
<b>Chlortetracyclin</b> 	331	Engels et al., 2004 {Winckler, 2004 #190}
	203	Winckler et al., 2004 (Einzelwert) {Grote, 2005 #173}
	50	Grote, 2005 {Winckler, 2001 #161}
<b>Tetracyclin</b> 	66	Winckler 2001 {Engels, 2004 #93}
	46	Engels 2004 {Engels, 2004 #172}
<b>Oxytetracyclin</b> 	136	Engels et al., 2004 {Kues, 2004 #189}
	19	Kues et al., 2004 {Grote, 2005 #173}
<b>Sulfadiazin</b> 	> 200	M. Grote, 2005 {Engels, 2004 #172}
	235	Engels et al., 2004 {Grote, 2005 #173}
<b>N<sup>4</sup>-Acetyl-Sulfadiazin</b>	300	M. Grote, 2005 {Pfeifer, 2002 #159}

	0,27	Pfeifer et al., 2002 {Winckler, 2004 #190}
<b>Sulfamethazin</b> 	167	Winckler et al., 2004 {Engels, 2004 #93}
	62,1	H. Engels, 2004 {Kues, 2004 #189}
	40	Kues et al., 2004 {Pfeifer, 2002 #159}
<b>Trimethoprim</b> 	< 0,1	Pfeifer et al., 2002 {Haller, 2002 #19} Haller et al., 2002 {Grote, 2005 #173}
	15 (Einzelwert)	Grote et al., 2004 {Eberhard, 2008 #170}

### 3.3.3 Vorkommen von Desinfektionsmittel

Desinfektionsmittel finden im Veterinärbereich für die Stallhygiene oder bei Krankheitsfällen Anwendung. Hierbei kommen meist Flächendesinfektionsmittel zum Einsatz, die aus mehreren Komponenten bestehen. Als Inhaltsstoffe können u. a. Aldehyde, Alkohole, kationische oder anionische Tenside, Wasserstoffperoxid, Säuren oder Basen vorkommen. Somit kann angenommen werden, dass diese Stoffe in Gülle oder anderen Gärsubstraten als Verunreinigung auftreten. Substrate aus der Lebensmittelverarbeitung oder Abfälle aus Brauereien können ebenso mit Desinfektionsmitteln belastet sein, da Arbeitsflächen oder Behälter regelmäßig entkeimt werden müssen. Die Literaturangaben (Maximalwerte) für das Vorkommen von quartären Ammoniumverbindungen in Gärrückständen liegen für BAC-C12 bei 119 mg/kg, für BAC-C14 bei 48 mg/kg und für BAC-C16 bei 1,5 mg/kg [B, #0].

### **3.4 Wirkung verschiedener Hemmstoffe auf die Biogasbildung**

In diesem Kapitel soll ein Überblick gegeben werden, ob und in welchem Maße diese Einträge von Schwermetallen, Antibiotika und Desinfektionsmitteln eine Hemmwirkung auf die biogaserzeugenden Mikroorganismen haben.

#### **3.4.1 Hemmwirkung von Schwermetallen**

Zu hohe Schwermetallkonzentrationen können hemmend oder sogar toxisch auf die Mikroorganismen im Biogasprozess wirken {K, #0}. Kupfer besitzt zwischen Konzentrationen von 40 und 150 mg/L eine hemmende Wirkung auf die Mikroorganismen im Biogasprozess [20-22]. Die Literaturangaben für die toxische Konzentration von Kupfer liegen zwischen 170 mg/L und 300 mg/L {Varel, 1982 #74}.

#### **3.4.2 Hemmwirkung von Antibiotika**

Auch Antibiotika wurden schon früh als Hemmstoffe erkannt. Monensin konnte 1982 als starker Hemmstoff einer anaeroben Fermentation mit Rindergülle identifiziert werden {B, #0}. Im Rahmen dieser Versuche wurde Gülle dotiert, indem Rinder mit antibiotikahaltigem Futter gefüttert wurden. Diese Untersuchungen sollten zeigen, ob sich die in der Rindergülle befindlichen Mikroorganismen an die Antibiotika adaptieren können oder nicht. Monensin (29 mg/kg Futter) brachte bei diesen Versuchen die Methanproduktion zum völligen Erliegen. Für die ebenfalls getesteten Antibiotika Salinomycin (20 mg/kg Futter), Lasalocid (16,5 mg/kg Futter) und Avoparcin (5 - 45 mg/L Direktzugabe in Fermenter) konnte eine Adaption nach einer anfangs geringen Hemmung der Methanproduktion am Anfang der Fermentationen beobachtet werden. Auch die Anwesenheit des Kombinationspräparates CTP, welches aus 200 mg/mL Chloramphenicol, 50 mg/mL Tylosin und 5 mg/mL Prednisolon besteht, führt ab einer Konzentration von 1,5 mL/L im Zulauf zu einer nachhaltigen Störung der Biogasproduktion {Sanz, 1996 #82}. Sanz et al. untersuchten im Jahr 1996 vor allem die Hemmwirkung von Proteinbiosynthese- und Zellwandsynthese-hemmenden Antibiotika auf acetogene und methanogene Bakterien {Massé</Author>2000, #75}. Erstmals wurde im Rahmen dieser Arbeit die differenzierte Hemmwirkung auf verschiedene Bakterienarten von Antibiotika untersucht. Durch die anaeroben batch-Versuche mit Klärschlamm, der mit den entsprechenden Antibiotika dotiert wurde, konnte Chlortetracyclin (CTC) als starker Hemmstoff sowohl auf die acetogene als auch auf die methanogene Bakterienpopulation identifiziert werden. CTC hemmte die Biogasproduktion bereits ab einer Konzentration von 40 mg/L, wobei die methanogenen Bakterien erst ab CTC-Konzentrationen von 200 mg/L stark gehemmt wurden. Doxycyclin, Tylosin und einige andere Aminoglykosid-Antibiotika haben eine teilweise Hemmwirkung auf die Methanproduktion, da sie die acetogenen Bakte-

rien hemmen. Eine ebenfalls starke Hemmung wird für Chloramphenicol angegeben {Lallai, 2002 #18}. Der veterinärmedizinische Einsatz von Chloramphenicol bei landwirtschaftlichen Nutztieren ist allerdings in der EU verboten.

Massé et al. untersuchten im Jahr 2000 die Auswirkungen von verschiedenen Antibiotika auf eine anaerobe, psychrophile (Prozesstemperatur = 20 °C) Fermentation im batch-Betrieb mit Schweinegülle {Schänzler, 2000 #177}. Die antibiotikahaltige Gülle wurde durch die kontrollierte Fütterung von Schweinen mit antibiotikahaltigem Futter erzeugt. Die für die Fermentation verwendete Gülle hatte einen hohen Trockensubstanzgehalt, welcher zwischen 9 % und 14,5 % variierte. Die Konzentrationen der Antibiotika im Futter entsprachen der in der Veterinärmedizin üblichen Maximaldosis. Eine signifikante Hemmung zeigten Penicillin (16 mg/kg Futter) und Tetracyclin (550 mg/kg Futter). Durch Zugabe dieser Antibiotika wurde die Methanproduktion um 25 - 35 % reduziert. Nach einiger Zeit erholte sich die Bakterienpopulation allerdings von diesen Hemmstoffen und die Biogasproduktion stieg wieder an. Für Sulfamethazin (110 mg/kg Futter), Lincomycin (220 mg/kg Futter), Tylosin (110 mg/kg Futter), und Carbadox (55 mg/kg Futter) konnte keine Beeinträchtigungen der Prozessstabilität beobachtet werden. Da die Schweinegülle nicht direkt dotiert wurde, kann hieraus nur eine qualitative Aussage über die Hemmwirkung dieser Stoffe abgeleitet werden.

Lallai et al. führten anaerobe Fermentationen mit direkt dotierter Schweinegülle in 160-mL-Serum-Flaschen bei 37 °C im Batchverfahren durch {Wellinger, 1991 #211}. Die verwendete Gülle hatte einen Trockensubstanzgehalt von 9,7 g/L. Bei der Untersuchung der Hemmwirkung der Antibiotika Thiamphenicol, Amoxicillin und Oxytetracyclin zeigte sich, dass Thiamphenicol bei 80 und 160 mg/L und Amoxicillin bei 60 und 120 mg/L eine signifikante Hemmung hervorrufen. Oxytetracyclin zeigte weder bei 125 noch bei 250 mg/L eine signifikante Hemmwirkung. Jedoch konnte selbst bei den gehemmten Fermentationen eine Adaptionsphase der Bakterienpopulation an die antibiotikahaltige Umgebung festgestellt werden. Bei dem Ansatz mit Amoxicillin stieg die Gasproduktion nach 200 Stunden wieder an, bei dem stärker hemmenden Thiamphenicol erst nach 400 Stunden.

Der Einsatz von Chloramphenicol und Thiamphenicol ist seit 2004 durch ein EU-Gesetz verboten. Monensin ist ein Futterzusatzstoff, der nur bei Rindern eingesetzt wird, und spielt daher für dieses Forschungsvorhaben, in dem hauptsächlich Schweinegülle betrachtet werden soll, eine untergeordnete Rolle.

### **3.4.3 Hemmwirkung von Desinfektionsmitteln**

Neben Futterzusatzstoffen und therapeutisch eingesetzten Antibiotika können auch Desinfektionsmittel die Biogasproduktion hemmen, wenn sie in sehr hohen Konzentrationen eingebracht werden {Hummel, 1999 #178}. Diese hohen Konzentrationen treten z. B. im Tierseuchenfall oder bei einer unsachgemäßen Überdosierung der Desinfektionsmittel nach dem Motto „viel hilft viel“ auf. Werden normale Routinedesinfektionen mit den empfohlenen Mengen durchgeführt, ist bei den meisten Desinfektionsmitteln kein negativer Einfluss auf den Biogasprozess durch belastete Gülle zu erwarten. Allerdings ist für die Desinfektionsmittel Dekaseptol, Durosept, Incidin anticoc und Lysococ auch bei korrekter Dosierung mit einer signifikanten Hemmung der Biogasproduktion zu rechnen {Schwarz, 2003 #180}.

### **3.5 Mikrobielle Hemmtests**

Nachweissysteme für die Hemmung des mikrobiellen Wachstums durch Antibiotika können nach ihrer Aussagekraft in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die besonders exakten Testsysteme bzw. Testmethoden zur Empfindlichkeitsbestimmung bei der Resistenztestung stehen den kommerziellen, mikrobiellen Hemmtests bzw. Schnelltestsystemen gegenüber, die lediglich eine qualitative Aussage über den Gehalt bestimmter Antibiotika in Lebensmitteln (Milch, Hühnereier) bzw. Schlachttieren ermöglichen. Diese letzteren, kommerziell erhältlichen Schnelltests werden daher als schnelle Screeningverfahren zur günstigen Vor-Ort-Überprüfung verschiedener Lebensmittel auf Antibiotikarückstände eingesetzt. Die Tests zur Empfindlichkeitsbestimmung ermöglichen hingegen eine quantitative, reproduzierbare Aussage darüber, ob und ab welcher Konzentration ein betrachteter Testorganismus von einem bestimmten Antibiotikum angegriffen wird. Im Gegensatz zu den mikrobiellen Schnelltests können die Tests zur Empfindlichkeitsbestimmung und Resistenzbildung nur im Rahmen von umfangreichen Laboruntersuchungen durchgeführt werden.

#### **3.5.1 Tests zur Empfindlichkeitsbestimmung**

Das Ziel der Tests zur Empfindlichkeitsbestimmung ist die sogenannte minimale Hemmkonzentration (MHK) zu ermitteln, ab der ein antimikrobieller Wirkstoff das Bakterienwachstum hemmt. Die MHK ist wie folgt definiert: „Die minimale Hemmkonzentration ist die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffes (angegeben in  $\mu\text{g/mL}$  bzw.  $\text{mg/L}$ ), bei der unter definierten *in vitro*-Bedingungen die Vermehrung von Bakterien innerhalb einer festgelegten Zeitspanne verhindert wird“ {Schwarz, 2004 #179}.

Folgende Verfahren werden zur Erforschung der Antibiotika-Resistenz von Bakterien verwendet:

- Agardiffusionstest
- Dilutionsverfahren: Agar-, Mikro- und Makrodilutionsverfahren
- E-Test®

Bei den **Agardiffusionstests (Hemmhoftests)** erfolgt die Diffusion des Antiinfektivums aus einem mit einer definierten Wirkstoffmenge beschickten Testblättchen in den mit immobilisierten Bakterien versehenen Agar-Nährboden, wodurch um das Blättchen ein Wirkstoffgradient entsteht. Je nachdem wie empfindlich die Bakterien auf den Wirkstoff reagieren, erfolgt eine Unterdrückung des Bakterienwachstums im Bereich des Wirkstoffgradienten. Dieser Bereich wird Hemmhof genannt; sein Durchmesser (Hemmhofdurchmesser) gilt als Maß für die qualitative Beurteilung der Bakterien als „resistent“, „intermediär“ oder „empfindlich“. Je größer der Hemmhof ist, desto empfindlicher reagiert der Testkeim auf das getestete Antiinfektivum {Priebe, 2003 #181}. Diese Agardiffusionstests bzw. Hemmhoftests werden in vielen Laboratorien eingesetzt, um die MHK zu bestimmen. Aufgrund der Empfehlung der Arbeitsgruppe „Antibiotika-Resistenz“ sollten Agardiffusionstests aber nicht mehr zur Erforschung der Antibiotika-Resistenz von Bakterien verwendet werden. Sie sollten durch Bouillon-Mikrodilutionsverfahren ersetzt werden. {Priebe, 2003 #181}

Die so genannten **Bouillon-Dilutionsverfahren** werden auch als Reihenverdünnungstests bezeichnet. Bei diesen Reihenverdünnungstests wird zwischen Makrodilution und Mikrodilution unterschieden. Bei der **Makrodilution** wird von dem zu untersuchenden Testkeim ein Medium mit definierter Keimzahl erstellt (Bakteriengebrauchslösung) und in Reagenzröhrchen abgefüllt. Anschließend werden zu den Bakteriengebrauchslösungen in den Röhrchen die entsprechenden Antibiotika in definierten Konzentrationen hinzugegeben. In jedem dieser Reagenzröhrchen befindet sich die gleiche Menge an Medium mit der gleichen definierten Keimzahl, lediglich die Konzentration des getesteten Wirkstoffes nimmt in definierter Verdünnung ab. Als MHK gilt die niedrigste Wirkstoffkonzentration bei der kein sichtbares Bakterienwachstum mehr feststellbar ist. In dem Beispiel in Abbildung 3.2 ist also der Wert 0,25 µg/mL die gesuchte MHK.

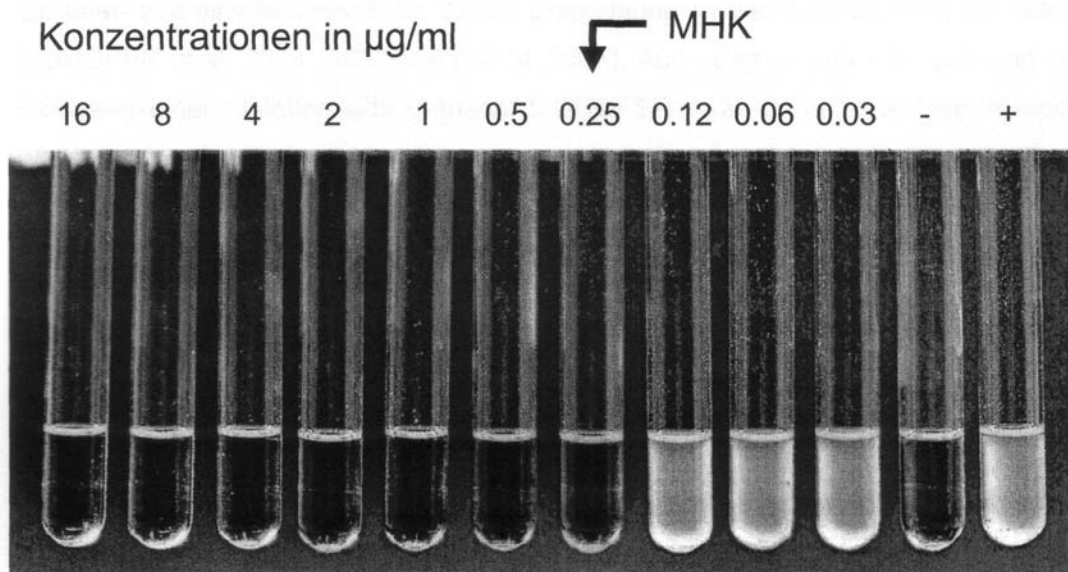


Abbildung 3.2: Resultat der in-vitro Empfindlichkeitsprüfung eines Erregers mittels Bouillon-Makrodilutionsverfahren {Rocks, 2005 #182}

Die **Mikrodilution** beruht auf demselben Testprinzip wie die Makrodilution. Statt der Reagenzröhrchen werden die Bakteriengebrauchslösung und der zu testende Wirkstoff jedoch in die Kavitäten von kommerziell erhältlichen Mikrotiterplatten pipettiert. Nach der Inkubationszeit ist das Ergebnis eines Mikrodilutionstests durch „Knopfbildung“ am Boden der jeweiligen Kavitäten zu erkennen (Abbildung 3.3). So kann die MHK optisch erfasst werden.

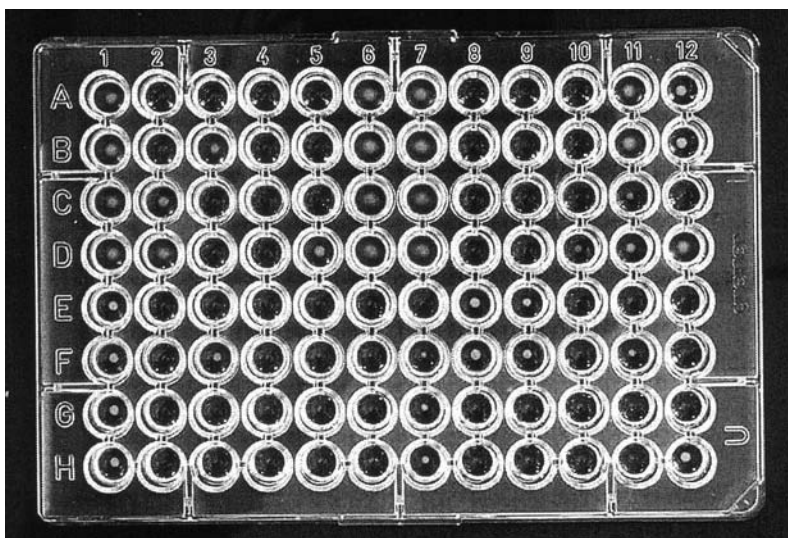


Abbildung 3.3: Ergebnis eines Bouillon-Mikrodilutionstests {Krey, 2004 #183}

Bei der MHK-Bestimmung ist zu beachten, dass die erzielte MHK nicht der tatsächlichen, absoluten MHK entspricht. Die MHK ist immer abhängig von der Größe des Faktors mit dem die Verdünnungsreihe erstellt wurde. Je geringer der Faktor, desto exakter ist die ermittelte MHK. Die „wahre“ MHK liegt zwischen der niedrigsten getesteten Antibiotikakonzentration,



welche den Testorganismus vollständig hemmt und der nächstgeringeren Konzentration der jeweiligen Verdünnungsreihe {Stock, 2001 #184}.

Die MHK lässt sich auch mit einem festen Medium in Form der **Agardilution** bestimmen, die Funktionsweise ist analog zur Makro- und Mikrodilution. Das Medium wird bei diesem Verfahren durch Agar ersetzt. Die Bestimmung der MHK erfolgt ebenfalls optisch.

Ein weiteres anerkanntest Verfahren zur Ermittlung der MHK in der Empfindlichkeitsbestimmung ist der **ETest<sup>®</sup>** von der Firma AB Biodisk. Beim ETest<sup>®</sup> werden die Konzepte von Dilutions- und Diffusionsverfahren kombiniert, um gut reproduzierbare MHK zu erhalten. Der ETest<sup>®</sup> ist das einzige anerkannte kommerzielle Testverfahren, welches zur quantitativen Antibiotika-Sensibilitäts-Bestimmung in der Resistenzforschung eingesetzt werden darf und gut reproduzierbare MHK-Wertbestimmungen liefert. {Sczesny, 2001 #185}

Aus Sicht der medizinischen Diagnostik ist die minimale Hemmkonzentration eine unsichere Größe, da die MHK-Werte unter anderem stark vom Inokulum, dem verwendeten Medium und vom pH-Wert abhängen. Die Anwendung unterschiedlicher Methoden der Empfindlichkeitstestung, aber auch Variationen innerhalb einer Methode können zu unterschiedlichen MHK-Werten führen. Eine Vergleichbarkeit der mit Hilfe von Agardiffusionstest erhaltenen Daten und den Ergebnissen aus Empfindlichkeitstests mit Dilutionstechniken ist auch bei einer korrekten Interpretation der Agardiffusionstests oftmals sehr schwierig {Sczesny, 2001 #185; Bendix, 2003 #186}. Agardiffusionstests eignen sich nicht zur Empfindlichkeitsbestimmung im Rahmen der medizinischen Diagnostik bzw. im Rahmen der Resistenzforschung. Agardilution, Makrodilution und ETest<sup>®</sup> sind zwar geeignet im Hinblick auf die reproduzierbare Bestimmung der MHKs, doch das beste Verfahren zur reproduzierbaren Sensibilitätsprüfung ist das Mikrodilutionsverfahren unter Verwendung von Mikrotiterplatten und Isosensitest-“Bouillon“ mit einer definierten Keimkonzentration von 1 - 5 KBE/mL. {Bendix, 2003 #186}

### 3.5.2 Schnelltests

Im Gegensatz zu den zuvor diskutierten Methoden zur Empfindlichkeitsbestimmung für den Bereich der Resistenzforschung, die unter relativ großem Aufwand in speziellen mikrobiologischen Laboratorien durchgeführt werden müssen, gibt es eine Reihe von kommerziellen Testverfahren, die zur Vor-Ort-Bestimmung von Hemmstoffen in z. B. Lebensmitteln genutzt werden können. Mit diesen Tests lassen sich jedoch lediglich qualitative Aussagen über den Antibiotikagehalt erzielen, die im Sinne einer Ja-/Nein-Antwort im Bereich der Lebensmitteltestung vor Ort als ausreichend anzusehen ist. Die Nachweisgrenzen der Testsysteme lie-

gen dabei zumeist deutlich unterhalb der gesetzlich vorgeschriebenen Mindestkonzentration. Die bekanntesten kommerziell erhältlichen Testsysteme zum Screening von Antibiotika in Lebensmitteln sind:

- deutscher Dreiplattentest (DPT)
- EG-Vierplattentest
- Neue Niederländische Nierentest
- STOP-Test (Swab test on premises)
- CAST-Test (Calf antibiotic and sulfa test)
- Brillantschwarzreduktionstest
- Premi®-Test
- Charm II-Test

Der deutsche Dreiplattentest (DPT), der EG-Vierplattentest, der Neue Niederländische Nierentest sowie der STOP- und CAST-Test beruhen alle auf dem Prinzip des Agardiffusionstests [35]. Sie werden hauptsächlich zum Screening von Schlachttieren auf Antibiotikarückstände verwendet und liefern für diesen Zweck hinreichend genaue Aussagen. Bei dem DPT handelt es sich um einen Test, bei dem Agarplatten mit drei verschiedenen pH-Werten zur Testung von Nieren- und Muskelgewebe verwendet werden. Beim DPT wird *Bacillus subtilis* BG als Testkeim verwendet. Im Gegensatz zum DPT wird beim EG-Vierplattentest zusätzlich eine vierte Testplatte mit einem anderen Testkeim (*Micrococcus luteus*) verwendet.

Besonders zur Überprüfung von Hemmstoffen in Milch wird häufig der **Brillantschwarzreduktionstest** verwendet, welcher z. B. von den Firmen AiM (Analytik in Milch) oder DSM angeboten wird. Dieser Test basiert auf der Anzeige des Bakterienwachstums durch die dabei gebildeten Stoffwechselprodukte. Als Testkeim werden die Sporen von *Bacillus stearothermophilus* verwendet. Durch den thermophilen und sporenbildenden Testorganismus werden sehr selektive Bedingungen innerhalb des Testsystems geschaffen. Dies hat den Vorteil, dass ein Wachstum der Begleitflora verhindert wird und der Test nicht schon durch eine eventuelle Lagerung bei erhöhter Raumtemperatur reagiert. Ist die Milch hemmstofffrei, wird der Redoxindikator Brillantschwarz nach einer 2 – 3½-stündigen Bebrütung bei 65 °C durch die Stoffwechselprodukte der Bakterien zur farblosen Stufe reduziert. Sind Hemmstoffe in der Milch enthalten, findet kein Bakterienwachstum statt, und der Test behält seine ursprüngliche Violettfröbung. Der Test ist in unterschiedlichen Varianten erhältlich, bei denen pH-Wert und Sporendichte variieren. Durch diese Variation können unterschiedliche Nach-

weisgrenzen realisiert werden. So lassen sich Penicilline, Makrolid-Antibiotika, Sulfonamide, Tetracycline und Chloramphenicol nachweisen. {Hamscher, 2005 #59}

Ein weiterer Test, der eine mikrobielle Stoffwechselreaktion sichtbar macht, ist der **Premi<sup>®</sup>Test**, welcher von der Firma DSM Food Specialities als Screeningtest für Antibiotikarückstände in Fleisch, Fleischprodukten und Eiern angeboten wird. Bildet der thermophile Testkeim *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis* Säure, wird dies durch einen Farbumschlag des pH-Indikators Bromkresolpurpur von violett nach gelb angezeigt. {Teutenberg, 2006 #60} Bei diesem Testsystem sind Sporen des thermophilen Testkeims in einem halbfesten Vollmedium immobilisiert. Nach der Inkubation der Teströhrchen für etwa drei Stunden bei 64 °C findet ein pH-Wert abhängiger Farbumschlag von violett nach gelb statt, wenn die Probe frei von Hemmstoffen ist. Mit dem Premi<sup>®</sup>Test lassen sich  $\beta$ -Lactame, Cephalosporine, Makrolide, Tetracycline, Sulfonamide, Aminoglykoside, Quinolone, Polypeptide und andere Antibiotika nachweisen. Mittlerweile bietet die Firma DSM Food Specialities auch einen Premi<sup>®</sup>Test für die Anwendung mit Urin von Schweinen und Rindern an.

Der **Charm II-Test** ist ein mikrobiologischer Rezeptortest, welcher antibiotische Rückstandsgehalte durch emittierte Strahlungsmengen detektieren kann {Bester, 2003 #204}. Je größer die emittierte Strahlungsmenge ist, umso geringer ist der Rückstandsgehalt in der Probe. Dieser Test ist ein Screeningverfahren für Tetracycline, Makrolide, Sulfonamide, Aminoglykoside und Chloramphenicol. Die Firma Charm Sciences Inc. gibt eine Inkubationszeit von 15 Minuten an. Die Alta Deutschland GmbH bietet einen Charm Hemmstoff Schnelltest zur Überprüfung von Milch auf  $\beta$ -Lactam-Antibiotika an, der eine Inkubationszeit von 8 Minuten benötigt. Nach der Inkubation des mit Milch getränkten Teststreifens kann abgelesen werden, ob die Milch frei von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ist (Herstellerangaben Alta Deutschland GmbH).

Die Auswahl des mikrobiellen Hemmtests erfolgt im Hinblick auf seinen Anwendungszweck. Um eine qualitative Aussage über den Gehalt verschiedener Antibiotika in einer Probe zu machen, liefert ein kommerzieller Hemmtest, welcher auf dem Prinzip der Agardiffusion (DPT, STOP-Test etc.), der Sichtbarmachung einer mikrobiellen Stoffwechselreaktion (BRT-Test, Premi<sup>®</sup>Test) oder eines Rezeptortests (Charm II-Test) basiert, eine hinreichend genaue Aussage. Diese Hemmtests zeichnen sich durch eine kurze Inkubationszeit und eine einfache Handhabung aus. Ist aber eine quantitative Aussage über die Empfindlichkeit eines Bakteriums gegenüber einem antimikrobiellen Wirkstoff gefragt, müssen umfangreiche Studien in mikrobiologischen Laboratorien durchgeführt werden. Bei diesen Studien wird zu-

meist das Testverfahren der Mikrodilution nach DIN 58940-81 mit Mikrotiterplatten verwendet.

### **3.6 Forschungsziel**

In diesem Forschungsvorhaben wurden folgende zwei Ziele verfolgt:

1. Erarbeitung von Kriterien zur Beurteilung und Vermeidung der auf hemmstoffhaltige Substrate zurückzuführenden Betriebsstörungen von Biogasanlagen
2. Entwicklung eines kostengünstigen anaeroben Testsystems zur summarischen Erfassung von Hemmstoffen in Wirtschaftsdüngern und anderen Fermentationssubstraten.

#### **3.6.1 Angestrebte Forschungsergebnisse**

Der Einsatz von hemmstoffbelasteten Rohstoffen wie z. B. mit Antibiotika belastete Gülle oder Milch, kann den Fermentationsprozess bei der Biogasgewinnung hemmen. Durch die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit von ausgewählten Hemmstoffen sollten Erkenntnisse zu deren Einfluss auf die Säurebildung und die Methanogenese gewonnen werden. Diese Einzelergebnisse stellen die Grundlage für die Festlegung von Schwellenwerten bzw. -bereichen dar, ab dem diese Substrate den Biogasprozess signifikant stören. Bei dem zu entwickelnden Testsystem sollte die Hemmstoffkonzentration bzw. das Erreichen des zur Hemmung führenden Schwellenwerts mit Hilfe einer einfach abzulesenden Farbreaktion angezeigt werden.

Mit dem Abschluss dieses Forschungsprojektes sollten zum einen fundierte Erkenntnisse über die Beeinträchtigung der Biogaserzeugung durch den Einsatz hemmstoffbelasteter Substrate vorgelegt werden. Zum anderen wurde ein mikrobieller Schnelltest zur Beurteilung von angelieferten Substraten entwickelt. In Kombination mit dem entwickelten Schnelltest können somit die Biogasanlagenbetreiber zukünftig in die Lage versetzt werden, den Einsatz hemmender Substrate zu vermeiden. Insgesamt sollte durch die in diesem Forschungsprojekt zu erwartenden Ergebnisse der Wirkungsgrad und die Verfügbarkeit und damit die Wirtschaftlichkeit der Biogasanlagen deutlich verbessert werden.

#### **3.6.2 Innovativer Beitrag der angestrebten Forschungsergebnisse**

Derzeit sind noch keine Verfahren zur kostengünstigen und zeitnahen Ermittlung und Beurteilung der Hemmstoffbelastung von Gärsubstraten und ihres Störpotentials für Gärprozesse verfügbar. Die Bereitstellung eines Schnelltests stellt einen deutlichen innovativen Schritt gegenüber den mindestens 28 Tage dauernden Gärtests oder der sehr aufwändigen und teuren instrumentellen Analytik dar.

Mit Hilfe eines mikrobiellen Schnelltests, der die Auswirkungen verschiedener Hemmstoffe summarisch erfasst, lassen sich im Gegensatz zur instrumentellen Analytik, bei der nur be-

kannte Einzelstoffe geprüft werden, auch die Wirkungen von z. B. Abbauprodukten der hemmenden Einzelsubstanzen erfassen.

Die Entwicklung eines geeigneten Probenvorbereitungsverfahrens für die schnelle und kostengünstige Vor-Ort-Bestimmung unter anaeroben Bedingungen mit einem minimalen Einsatz an Gerätetechnik und dem Verzicht auf toxische Lösungsmittel war hierbei eine besondere Herausforderung.

Die Fähigkeit der Mikroorganismen, sich an unterschiedliche Bedingungen in Biogasanlagen zu adaptieren und dem Prozess angepasste spezifische Mikroorganismen-Populationen zu bilden, sollte bei der Testentwicklung berücksichtigt werden. Dazu war der Einsatz der anlagenspezifischen Mischkultur als Inokulum für den Schnelltest geplant, so dass Störeinflüsse unter den gleichen Bedingungen wie bei der Fermentation untersucht werden können.

Da es aus Kostengründen bisher nur sehr wenige Untersuchungen zu den Auswirkungen von Hemmstoffen in Biogasanlagen gibt, ist durch die breite Anwendung eines solchen Hemmstofftests als Nebenprodukt in den nächsten Jahren mit einer größeren Datenmenge zum Vorkommen von Hemmstoffen in Gärsubstraten zu rechnen. Zukünftig wird hierdurch auch die Entwicklung geeigneter Verfahrensvarianten zur Optimierung der Energieausbeute möglich.

Der Schnelltest soll von den Biogasanlagenbetreibern und ggf. auch von den Substratanbietern sehr einfach selbst durchgeführt werden können.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Aufbau der Analysenmethoden

In der ersten Projektphase wurden sowohl am IUTA als auch an der TiHo die bisher für Gülle bestehenden Analysenverfahren evaluiert. Aufbauend auf den validierten Analysenverfahren zur Bestimmung verschiedener Sulfonamide und Tetracycline in Gülle sollten für weitere wichtige Wirkstoffe und Metaboliten der Sulfonamide neue Analysenverfahren entwickelt werden bzw. die bestehenden Methoden erweitert werden. Für die Untersuchung von Desinfektionsmitteln in Gülle wurden Analysemethoden zur Untersuchung von Klärschlamm- oder Abwasserproben für quartäre Ammoniumverbindungen und Triclosan zur Anwendung in Gülle und Gärsubstraten weiterentwickelt.

#### 4.1.1 Sulfonamide

##### 4.1.1.1 Sulfonamide (HPLC-Ion Trap-MS-Methode)

Für die Substanzgruppe der Sulfonamide wurde an der TiHo ein Extraktionsverfahren basierend auf einem bestehenden, schnellen Flüssig-Flüssig-Extraktionsverfahren {, 1985 #206}, in Kombination mit einem selektiven und sensitiven Nachweisverfahren (HPLC-ESI-MS-MS) um drei Sulfonamidmetabolite und Trimethoprim (TMP), einem Sulfonamidsynergisten, erfolgreich erweitert. Folgende Sulfonamide und Sulfonamidmetabolite können nun analysiert werden: Sulfadiazin (SDZ), Acetyl-Sulfadiazin (AC-SDZ), Sulfathiazol (STZ), Sulfamerazin (SMR), Acetyl-Sulfamerazin (AC-SMR), Sulfamethazin (SMZ), Acetyl-Sulfamethazin (AC-SMZ), Sulfamethoxypyridazin (SMPD), Sulfamethoxazol (SMX), Sulfadimethoxin (SDM). Die anschließende Analyse muss aufgrund der Bestimmung mittels Ion-Trap-MS und der damit verbundenen Notwendigkeit von basisliniengetrennten Peaks an der TiHo mittels zweier HPLC-Läufe durchgeführt werden. In Abbildung 4.1 sind beispielhaft zwei Chromatogramme sowie in den Tabellen 4.1 bis 4.3 die entsprechenden Mess- und Validierungsparameter dargestellt.

Tabelle 4.1: HPLC-Gradient: Sulfonamide (TiHo)

<b>Zeit [min]</b>	<b>Mobile Phase A [%]</b>	<b>Mobile Phase B [%]</b>
0	100	0
1	100	0
10	75	25
11	50	50
14	50	50
15	1	99
18	1	99
19	100	0
27	100	0

A: 0,5 %ige Ameisensäure + 10 mM Ammoniumacetat; B: Acetonitril

Tabelle 4.2: Messparameter: Sulfonamide, Acetylierte Sulfonamide, Trimethoprim (TiHo)

<b>Substanz</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup> (m/z)</b>	<b>Isolierungs- weite (m/z)</b>	<b>Stoß- energie [%]</b>	<b>Fragmentionen</b>
Sulfadiazin	251,1	1,0	30	156, 174
Acetyl-Sulfadiazin	293,2	1,0	32	136, 198, 227
Sulfathiazol	256,1	1,0	27	156
Sulfamerazin	265,1	1,0	30	156, 174, 190
Acetyl-Sulfamerazin	307,2	1,0	32	136, 190, 198, 241
Sulfamethazin	279,1	1,0	30	204
Acetyl-Sulfamethazin	321,2	1,0	32	198, 204, 255
Sulfamethoxypyridazin	281,1	1,0	30	108, 126, 156, 215
Sulfamethoxazol	254,1	1,0	34	147, 156, 188, 190, 194
Sulfadimethoxin	311,1	1,0	33	156, 218, 245
Trimethoprim	291,3	1,0	47	123, 230, 258, 261, 275, 276

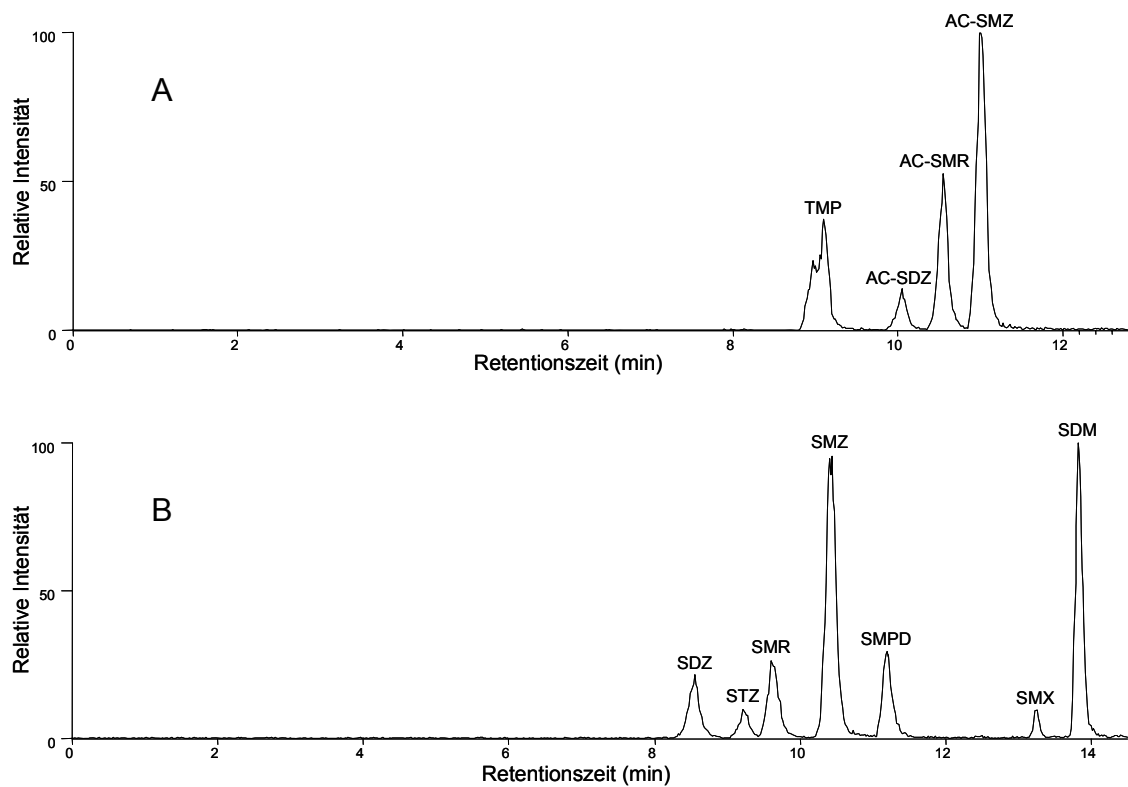


Abbildung 4.1: HPLC-Ion Trap-MS Chromatogramme für die Trennung von 7 Sulfonamiden, 3 N<sup>4</sup> acetylierten Sulfonamiden und TMP in Gülle. A: Gülleprobe gespiked mit 1000 µg/kg TMP, AC-SDZ, AC-SMR und AC-SMZ. B: Gülleprobe gespiked mit 1000 µg/kg SDZ, STZ, SMR, SMZ, SMPD, SMX und SDM

Tabelle 4.3: Validierungsparameter: Sulfonamide in Gülle

Substanz	Zusatz [µg/kg]	WDF [%]
Sulfadiazin	100 - 5.000	89,0 ± 17,6
Sulfathiazol	100 - 5.000	76,0 ± 11,8
Sulfamerazin	100 - 5.000	90,8 ± 6,0
Sulfamethazin	100 - 5.000	103,5 ± 19,1
Sulfamethoxyypyridazin	100 - 5.000	89,5 ± 17,1
Sulfamethoxazol	100 - 5.000	65,0 ± 5,2
Sulfadimethoxin	100 - 5.000	112,6 ± 12,8
Acetyl-Sulfadiazin	50 - 5.000	90,8 ± 17,3
Acetyl-Sulfamerazin	50 - 5.000	118,5 ± 9,7
Acetyl-Sulfamethazin	50 - 5.000	108,2 ± 6,0
Trimethoprim	50 - 5.000	41,5 ± 2,1

Während der Methodenentwicklung zeigte sich, dass sich für die Sulfonamide in verschiedenen (Antibiotika-freien) Güllen unterschiedliche Wiederfindungsraten ergeben. Da es sich bei der Matrix in den durchgeführten Gärtests um eine Mischung aus Gülle, Fermenterinhalt und Wasser handelt, wurde aus einem dieser Ansätze ein Antibiotika-freier Blindwert für die



Ermittlung der Wiederfindungen verwendet. Dabei ergaben sich die in Tabelle 4.4 aufgelisteten, reproduzierbaren Wiederfindungsraten (WDF) für die Sulfonamide.

Tabelle 4.4: Validierungsparameter: Sulfonamide in Gärsubstrat

<b>Substanz</b>	<b>Zusatz [µg/kg]</b>	<b>WDF [%]</b>
Sulfadiazin	50 - 5.000	73,1 ± 15,4
Sulfathiazol	50 - 5.000	68,4 ± 24,7
Sulfamerazin	50 - 5.000	72,8 ± 15,2
Sulfamethazin	50 - 5.000	88,0 ± 11,8
Sulfamethoxyridazin	50 - 5.000	70,9 ± 14,3
Sulfamethoxazol	50 - 5.000	95,0 ± 6,6
Sulfadimethoxin	50 - 5.000	75,7 ± 17,6

#### 4.1.1.2 Sulfonamide (HPLC-APCI-MS/MS-Methode)

Beim IUTA wurde im Rahmen dieses Forschungsvorhabens eine vorhandene Analysenmethode {Wiegel, 1989 #187} um drei Sulfonamide und einen Acetylmetaboliten erweitert und aus Kapazitätsgründen auf einem zweiten Tandemmassenspektrometer etabliert. Die Bestimmung der Fermentationsproben wurde mit Hilfe eines Shimadzu LC 20 Prominence HPLC Systems, gekoppelt mit einem Q Trap 3200 Massenspektrometer durchgeführt. Die chromatographische Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 0,3 mL/min auf einer 3 µm Phenomenex Luna C18-Säule (30 x 2 mm Vorsäule und 150 x 2 mm HPLC Säule). Die Ionisierung erfolgte mittels APCI (atmospheric pressure chemical ionisation) bei einer Temperatur von 450 °C und nachfolgend aufgeführten Gaseinstellungen: Curtain Gas 10 psi, Nebulizer und Turbo Gas jeweils 70 psi, Collision Gas 6 psi. Die Messung erfolgte mit einer Verweilzeit (dwell time) von 60 ms mit den in Tabelle 4.6 aufgeführten Einstellungen im MRM-Mode. Der HPLC-Gradient ist in Tabelle 4.5 aufgeführt. Abbildung 4.2 zeigt beispielhaft ein Chromatogramm einer mit Sulfonamiden und Trimethoprim dotierten Gülleprobe. Als Validierungsparameter für die entwickelte Methode sind in Tabelle 4.7 die Wiederfindungsraten (WDF) mit der zugehörigen Standardabweichung aufgeführt.

Tabelle 4.5: HPLC Gradient für HPLC-ACPI-MS/MS Methode, IUTA

<b>Zeit [min]</b>	<b>Mobile Phase A [%]</b>	<b>Mobile Phase B [%]</b>
0,5	95	5
7,5	60	40
9,5	0	100

A: Deionisiertes Wasser mit 0,1% Ameisensäure und 2 mM Ammoniumacetat

B: Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure

Tabelle 4.6: MS/MS-Einstellungen zur Messung der Sulfonamide am IUTA (HPLC-ACPI-MS/MS)

<b>Substanz</b>	<b>RT [min]</b>	<b>Q<sub>1</sub> [amu]</b>	<b>Q<sub>3</sub> [amu]</b>	<b>DP [V]</b>	<b>EP [V]</b>	<b>CE [V]</b>	<b>CEP [V]</b>	<b>CXP [V]</b>
Sulfadiazin	4,7	251	156	26	6	19	22	4
Acetyl-Sulfadiazin	5,3	293	134	46	4	33	16	4
Sulfamerazin	5,5	265	156	41	3,5	21	24	4
Acetyl-Sulfamerazin	5,7	307	134	36	5,5	31	18	4
Sulfamethazin	6,1	279	186	51	7,5	25	12	6
Acetyl-Sulfamethazin	6,0	321	186	46	10	29	14	4
Sulfamethoxazol	6,7	254	156	41	3,5	18	28	4
Sulfathiazol	4,9	256	156	36	8	19	14	4
Sulfamethoxypyridazin	5,9	281	156	31	5	21	20	4
Sulfadimethoxin	7,6	312	156	36	4	27	18	4
Trimethoprim	4,5	291	230	56	2,5	29	30	4

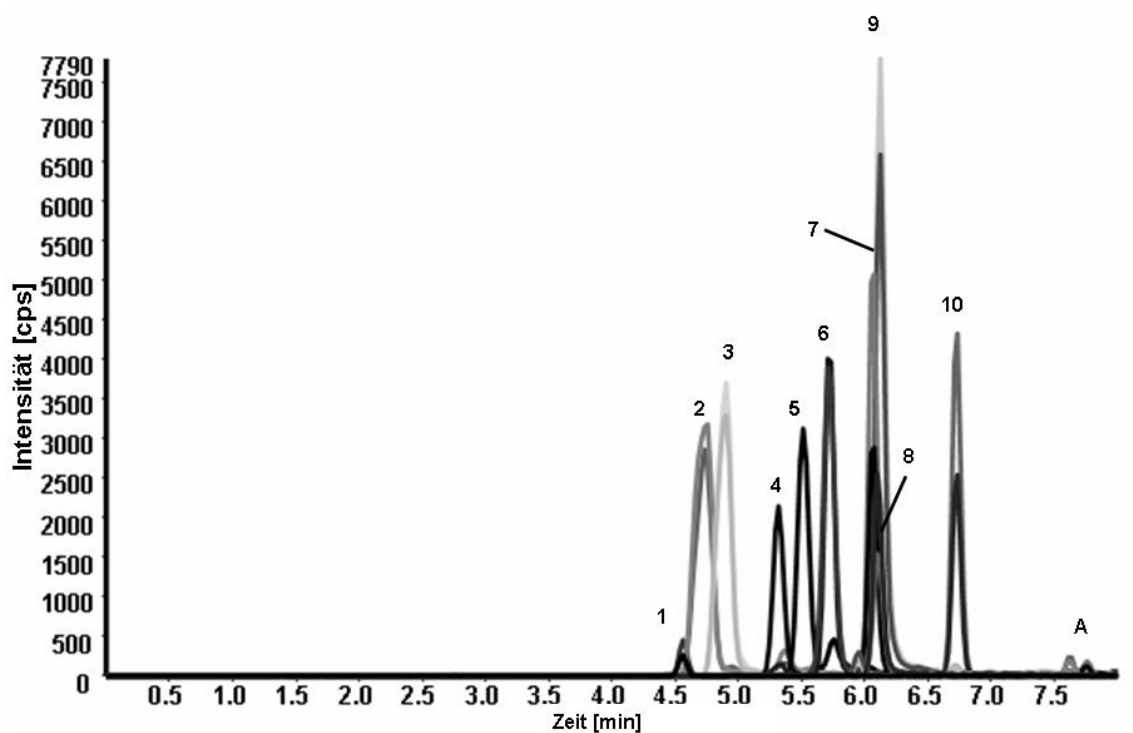


Abbildung 4.2: HPLC-ACPI-MS/MS (Triple-Quadrupol) Chromatogramm (TIC) für die Trennung von 5 Sulfonamiden, 3 N<sup>4</sup> acetylierten Sulfonamiden und TMP in Gülle (100 µg/kg gespiked), 1: TMP, 2: SDZ, 3: STZ, 4: Ac-SDZ, 5: SMR, 6: Ac-SMR, 7: Ac-SMZ, 8: SMDP, 9: SMZ, 10: SMX

Tabelle 4.7: Validierungsparameter für die HPLC-ACPI-MS/MS (Triple Quadrupol) Methode (IUTA)

Substanz	Zusatz [µg/kg]	WDF [%]
Trimethoprim	1 - 200	73,9 ± 21,6
Sulfadiazin	1 - 200	84,9 ± 18,0
Acetyl-Sulfadiazin	1 - 200	110,0 ± 12,0
Sulfamerazin	1 - 200	71,9 ± 19,9
Acetyl-Sulfamerazin	1 - 200	129,0 ± 1,4
Sulfamethazin	1 - 200	80,8 ± 21,5
Acetyl-Sulfamethazin	1 - 200	97,4 ± 18,2
Sulfamethoxazol	1 - 200	67,8 ± 21,9
Sulfathiazol	1 - 200	69,2 ± 14,8
Sulfamethoxypyridazin	1 - 200	54,5 ± 15,1
Sulfadimethoxin	1 - 200	68,3 ± 14,9

#### 4.1.1.3 Sulfonamide (HT-HPLC-ESI-MS/MS)

Neben der Standardmethode wurde zur Erzielung schnellerer Analysenzeiten und Anwendung bei den Laborvergleichsuntersuchungen eine Hochtemperatur-HPLC-Methode mit Elektrosprayionisation entwickelt (HT-HPLC-ESI-MS/MS). Hierzu wurde ein Agilent 1100/1200 HPLC System an die 3200 Q Trap gekoppelt. Zur Regelung des Temperaturgradienten für die mobile Phase wurde ein am IUTA entwickeltes Heizsystem {Häggstr, #0} verwendet. Die Trennung (Flussrate 1,4 mL/min) erfolgte auf einer Zorbax Stable Bond C18 Säule (50 x 3 mm, 1,8 µm), bei gleichzeitiger Anwendung eines Temperatur- und Lösemittelgradienten (Tabelle 4.8). Die Ionisierung erfolgte bei einer Temperatur von 750 °C. Aufgrund sehr niedriger Peakbreiten wurde zum Erhalt von genügenden Datenpunkten die Verweilzeit auf 5 ms reduziert. Die weiteren MS/MS-Parameter entsprechen der in Tabelle 4.6 dargestellten HPLC-ACPI-MS/MS Methode. In Abbildung 4.3 ist ein Chromatogramm der getrennten Substanzen (Sulfonamide und TMP) dargestellt.

Tabelle 4.8: Temperatur- und Lösemittelgradient für die HT-HPLC-ESI-MS/MS Methode (IUTA)

Zeit [min]	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]	Temperatur [°C]
0	93	7	70
2			90
2,5	85	15	90

A: Deionisiertes Wasser mit 0,1% Ameisensäure

B: Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure

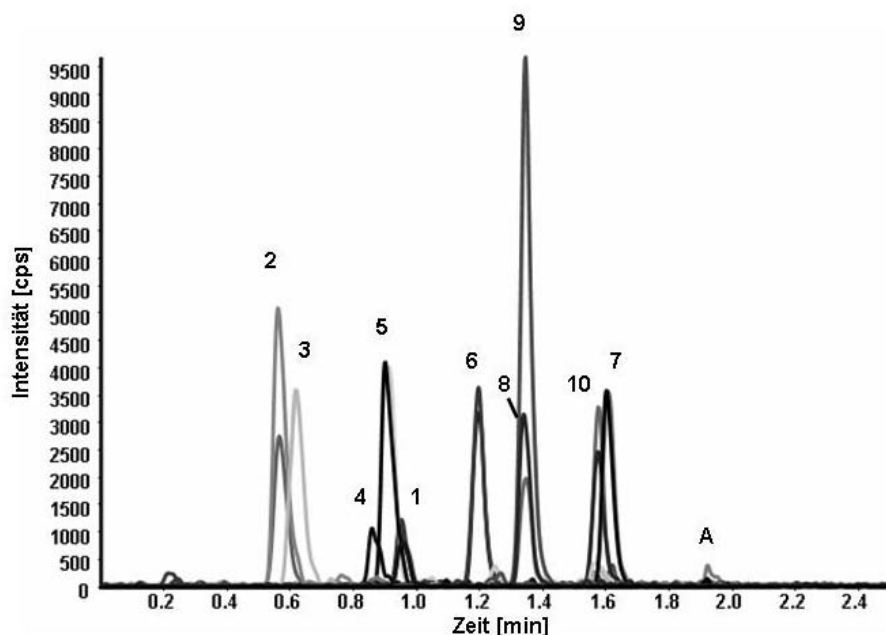


Abbildung 4.3: HT-HPLC-ESI-MS/MS Chromatogramm für die Trennung von 5 Sulfonamiden, 3 N4 acetylierten Sulfonamiden und TMP in Gülle (100 µg/kg gespiked); 1: TMP, 2: SDZ, 3: STZ, 4: Ac-SDZ, 5: SMR, 6: Ac-SMR, 7: Ac-SMZ, 8: SMDP, 9: SMZ, 10: SMX, A: unbekannte Störkomponente

### 4.1.2 Tetracycline

Neben der Methode zur Bestimmung von Sulfonamiden und deren Acetyl-Metaboliten in Gülle erfolgte in der zweiten Projektphase die Erweiterung einer bestehende Tetracyclin-Methode {Häggstr, #0} um Doxycyclin (DXC) und Oxytetracyclin (OTC) erweitert. Da Tetracyclin (TC) und Chlortetracyclin (CTC) Epimere bilden und Chlortetracyclin zusätzlich im Alkalischen isomerisiert und es zu nicht eliminierbaren Koelutionen kommt, wurden darüber hinaus einzelne LC-MS/MS-Messmethoden entwickelt. Somit ergeben sich drei verschiedene Messmethoden für die Bestimmung der Tetracycline, die mit nur einer Probenaufarbeitung (Flüssig-Flüssig-Extraktion) durchgeführt werden können:

- TC + Epi-TC
- CTC, Epi-CTC + Iso-CTC
- OTC + DXC

In Tabelle 4.9 sind die Messparameter für die erweiterten Methoden dargestellt. In weiteren Versuchen wurden Wiederfindungsraten für Chlortetracyclin und dessen Epimere/Isomere in Gärsubstrat bestimmt, da sich Substanzen in der Güllematrix anders verhalten. Für Iso-Chlortetracyclin ergaben sich reproduzierbare Wiederfindungsraten für einen relativ großen Konzentrationsbereich (50 - 5000 ppb). Hingegen konnten für Chlortetracyclin und sein Epi-Chlortetracyclin nur nach einer Verkleinerung des Konzentrationsbereichs (125 - 1000 ppb) verwertbare Wiederfindungsraten ermittelt werden.

Tabelle 4.9: Messparameter Tetracycline (TiHo)

Substanz	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Isolierungs- weite (m/z)	Stoßenergie [%]	Fragmentionen
Oxytetracyclin	461,1	1,6	20	443
Tetracyclin	445,1	1,4	20	427
Chlortetracyclin	479,1	1,6	27	444, 461, 462
Doxycyclin	445,1	1,6	22	428
Epi-Tetracyclin	445,1	1,4	20	427
Epi-Chlortetracyclin	479,1	1,6	27	444, 461, 462
Iso-Chlortetracyclin	479,1	1,6	27	444, 461, 462
Epi-Iso-Chlortetrayclin	479,1	1,6	27	444, 461, 462

Tabelle 4.10: HPLC-Gradient: Tetracycline (TiHo)

Zeit [min]	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]
0	100	0
1	100	0
10	50	50
11	50	50
12	1	99
15	1	99
16	100	0
24	100	0

A: 0,5 %ige Ameisensäure + 10 mM Ammoniumacetat; B: Acetonitril

Für die Methode der Chlortetracycline sind in Abbildung 4.4 ein Chromatogramm und die zugehörigen MS/MS-Spektren dargestellt.

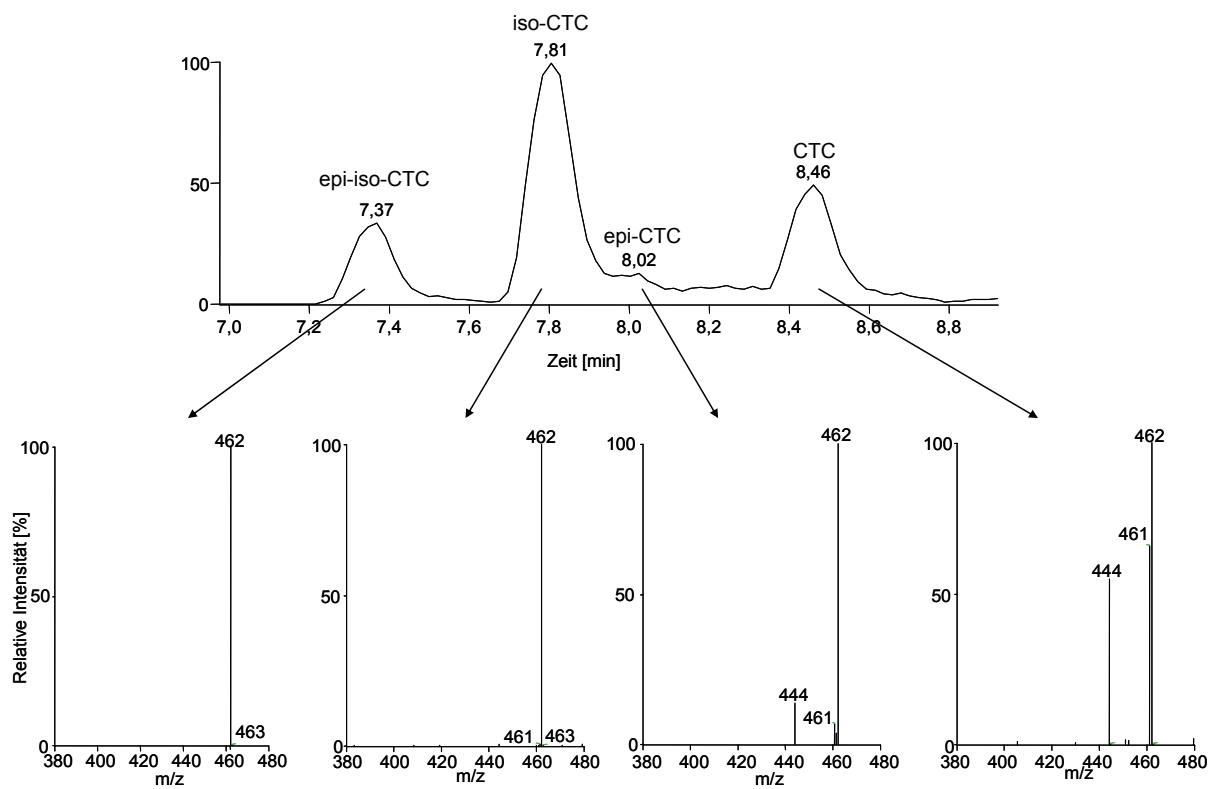


Abbildung 4.4: Chromatogramm und MS/MS-Spektren Chlortetracycline

Tabelle 4.11: Validierungsparameter: Tetracycline in Gärsubstrat (TiHo)

<b>Substanz</b>	<b>Zusatz [µg/kg]</b>	<b>WDF [%]</b>
Oxytetracyclin	100 - 1.000	81,9 ± 9,2
Tetracyclin + Epi-Tetracyclin	100 - 1.000	76,1 ± 12,8
Chlortetracyclin + Epi-Chlortetracyclin	125 - 1.000	122,1 ± 11,8
Iso-Chlortetracyclin + Epi-Iso-Chlortetracyclin	50 - 5.000	34 ± 8,4
Doxycyclin	100 - 1.000	136,6 ± 11,4

Am IUTA ist zur Analytik der Tetracycline eine HPLC-ESI-MS/MS Methode auf Grundlage einer Veröffentlichung von Hamscher et al. {S, #0} entwickelt und optimiert worden. Vor der Analytik erfolgte eine Aufarbeitung der Proben durch Extraktion mittels Ethylacetat unter Zugabe eines Citratpuffers. Nach dem Einengen wurden die Analyten in eine Acetonitril-Ammoniumacetat-Lösung aufgenommen und der Analytik zugeführt. Die Trennung erfolgte auf einer Sunfire C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) Säule bei einer Flussrate von 1 mL/min und einem Injektionsvolumen von 5 µL. Der Lösemittelgradient, sowie die Mess- und Validierungsparameter sind in den Tabellen 4.11 bis 4.14 aufgeführt. In Abbildung 4.5 ist ein Chromatogramm der getrennten Tetracycline dargestellt.

Tabelle 4.12: Lösemittelgradient für die Analytik der Tetracycline, IUTA

<b>Zeit [min]</b>	<b>Mobile Phase A [%]</b>	<b>Mobile Phase B [%]</b>
0	100	0
0,8	82	18
1,5	82	18
3	58	42
5	58	42
6	0	100
8	0	100
9	100	0
11	100	0

A: Deionisiertes Wasser mit 0,5 % Ameisensäure und 0,2 % Ammoniumacetatlösung

B: Acetonitril

Tabelle 4.13: MS Parameter für die Analytik der Tetracycline (IUTA)

Substanz	Q1 [amu]	Q3 [amu]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CEP [V]	CXP [V]
Oxytetracyclin	461	426	36	10,5	38	25	16
Tetracyclin	445	410	26	6	22	25	8
Chlortetracyclin	479	444	46	7	20	27	16
Anhydroxytetracyclin	427	154	41	5,5	20	37	4
Epi-Tetracyclin	445	410	36	4,5	18	25	14
Epi-Chlortetracyclin	479	444	31	7	22	29	16
Iso-Chlortetracyclin	479	197	46	8,5	20	55	8
Epi-Anhydroxitetrayclin	427	154	46	10,5	36	37	4

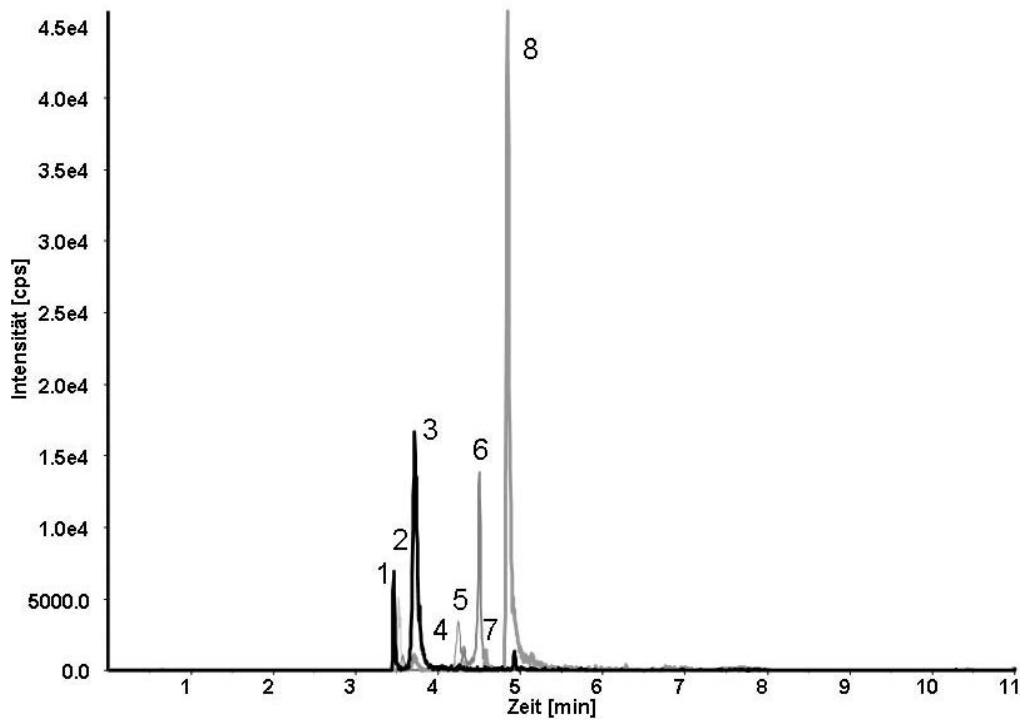


Abbildung 4.5: HPLC-ESI-MS/MS Chromatogramm einer aufgestockten Gülleprobe mit je 0,1 mg/kg pro Substanz 1: Epi-TC, 2: OTC, 3: TC, 4: Iso-CTC, 5: Epi-CTC, 6: CTC, 7: Epi-ATC, 8: ATC (TR Gülle: 5,5 %)



Tabelle 4.14: Wiederfindungsraten Tetracycline (IUTA)

<b>Substanz</b>	<b>Zusatz [µg/kg]</b>	<b>WDF [%]</b>
Oxytetracyclin	20 - 10.000	54 ± 2
Tetracyclin + Epi-Tetracyclin	20 - 10.000	54 ± 8
Chlortetracyclin + Epi-Chlortetracyclin	20 - 10.000	59 ± 12
Anhydroxytetracyclin + Epi-Anhydroxitetrayclin	20 - 10.000	94 ± 8
Iso-Chlortetracyclin	20 - 10.000	80 ± 9

#### 4.1.3 Quartäre Ammoniumverbindungen

Zur Analytik der quartären Ammoniumverbindungen wurde eine LC/MS-Methode (HPLC-ESI-MS-MS+) entwickelt {, 1985 #205}, die eine Messung der folgenden Substanzen in einem Lauf ermöglicht:

- Benzylododecyldimethyl-ammoniumbromid (BAB-C12)
- Benzyltetradecyldimethyl-ammoniumchlorid (BAC-C14)
- Benzylhexadecyldimethyl-ammoniumchlorid (BAC-C16)

Vor Analytik ist eine Probenaufbereitung mit Flüssig-Flüssig-Extraktion notwendig. Die Trennung erfolgt in einer 150 x 2 mm Phenomenex LunaC18-Säule (Partikelgröße 3 µm). Bei einer Flussrate von 0,3 mL/min und einem Injektionsvolumen von 20 µL wird ein Gradient mit den Eluenten A: Wasser mit Ammoniumacetat und 0,1 % Ameisensäure und B: Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure gefahren. Die Gradienteneinstellungen können Tabelle 4.15 entnommen werden.

Tabelle 4.15: HPLC-Gradient zur Bestimmung von quartären Ammoniumverbindungen

<b>Zeit [min]</b>	<b>Mobile Phase A [%]</b>	<b>Mobile Phase B [%]</b>
0,01	80	20
0,5	80	20
5	0	100
7	0	100
8	80	20
11	80	20

Die LC/MS-Einstellungen sowie die Validierung der Methode können den Tabellen 4.16 und 4.17 entnommen werden. Ein Beispielchromatogramm ist in Abbildung 4.6 dargestellt.

Tabelle 4.16: MS Einstellungen für die Analytik von quartären Ammoniumverbindungen (IUTA)

Substanz	Q <sub>1</sub> [amu]	Q <sub>3</sub> [amu]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CEP [V]	CXP [V]
BAB-C12	304	91	46	5,5	43	12	4
BAC-C14	332	91	61	6	47	16	4
BAC-C16	360	91	51	7	53	22	4

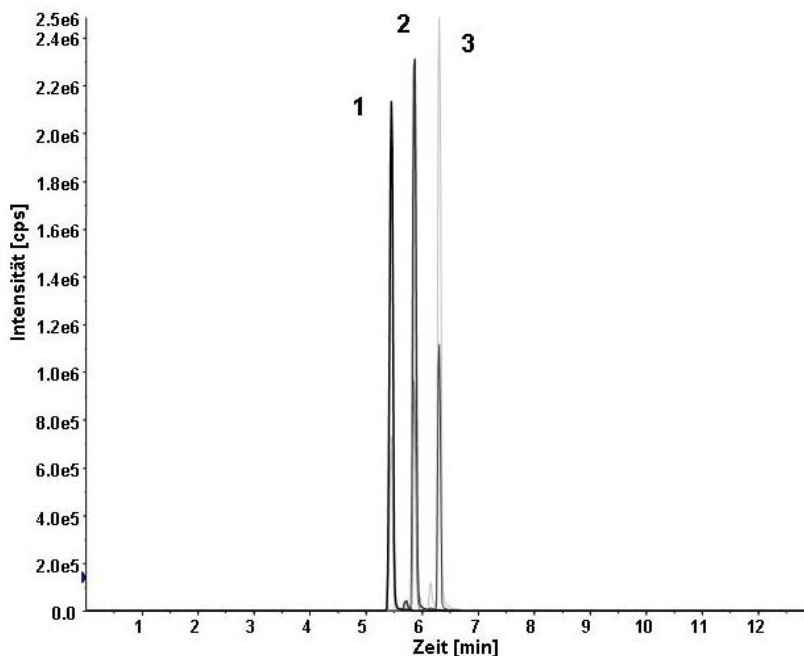


Abbildung 4.6: Beispielchromatogramm quartäre Ammoniumverbindungen in einer aufbereiteten Gülleprobe mit einer Konzentration von jeweils 25 mg/kg (TR: 8 %) 1: BAB-C12, 2: BAC-C14, 3: BAC-C16

Tabelle 4.17: Validierungsparameter quartäre Ammoniumverbindungen (IUTA)

Substanz	Zusatz [ µg/kg ]	WDF [%]
BAB-C12	10-200	62 ± 14
BAC-C14	10-200	63 ± 12
BAC-C16	10-200	72 ± 15

#### 4.1.4 Triclosan

Zur Analytik von Triclosan wurde basierend auf einer Veröffentlichung zur Untersuchung von Triclosan in Abwässern und Klärschlämmen {Halling-S, #0} ein Analysenverfahren mittels GC/MS entwickelt. Zur Probenaufarbeitung wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Toluol durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels internem Standard (Bisphenol-a D16), der vor Probenaufarbeitung zugegeben wurde. Um Matrix-Effekte durch die Gülle auszuschließen, wurde eine Matrix-Kalibration mit einer unbelasteten, aufgearbeiteten Gülleprobe durchgeführt.

Zur Analytik wurde ein Trace GC, gekoppelt mit einem DSQ MS der Fa. Thermo verwendet. Das System ist mit einem PTV Injektor ausgestattet, die Trennung erfolgte mit einer Optima-5-Accent Säule (0,25 µm, 30 m, 0,25 mm ID). Die Start-Temperatur des Injektors betrug 110 °C und der Liner wurde nach der Probenaufgabe (Splitless, 0,1 min) mit einem Gradienten von 10 °C/s auf 320 °C aufgeheizt. Das Temperaturprogramm für den Säulenofen wurde mit einer Starttemperatur von 110 °C begonnen. Bis 165 °C wurde mit einem Gradienten von 40 °C/min erwärmt, danach erfolgte übergangslos ein flacherer Temperaturanstieg von 4 °C/min auf 210 °C. Nach 5 min bei dieser Temperatur wurde der Ofen mit 30 °C/min auf die Endtemperatur von 280 °C aufgeheizt, welche dann für 15 min beibehalten wurde. Die Flussrate des Trägergases für die Gaschromatographie wurde konstant bei 1 mL/min gehalten und die MS Transferline Temperatur auf 320 °C eingestellt. Zur Auswertung wurde für Triclosan die Masse 288 m/z herangezogen, wobei die Massen 218, 220, und 292 m/z als Verifizierung dienen. Für den Internen Standard Bisphenol-a D16 wurden die Massen 224 und 242 m/z gescannt, wobei erstere zur Quantifizierung verwendet wurde. Die Validierungsparameter können der Tabelle 4.18 entnommen werden, ein Beispielchromatogramm findet sich in Abbildung 4.7.

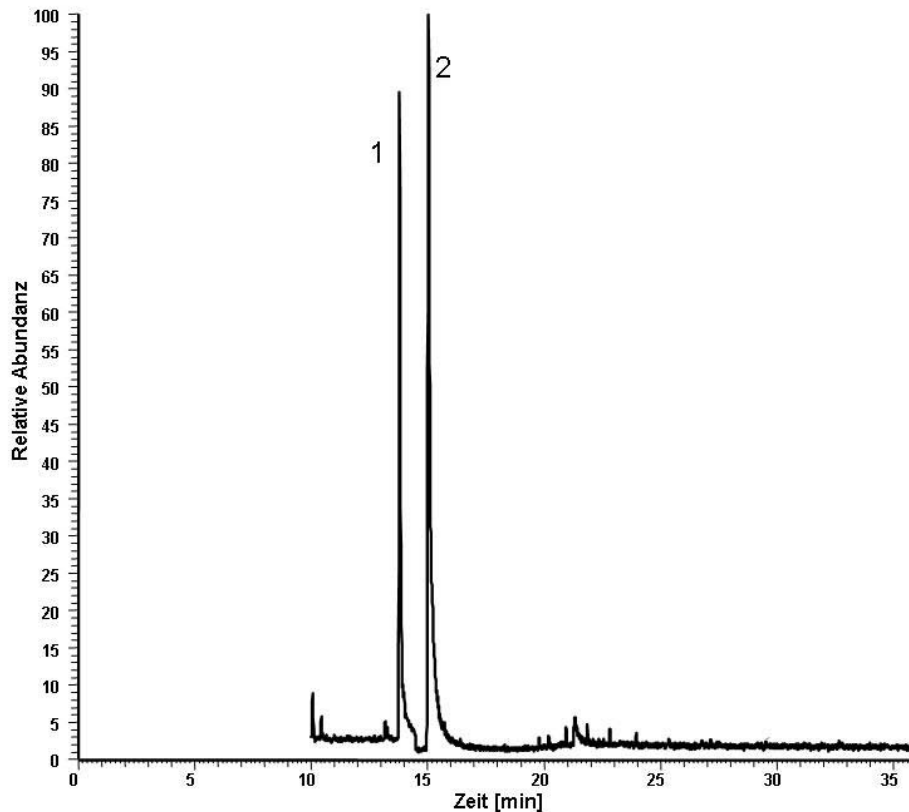


Abbildung 4.7: GC/MS Chromatogramm (TIC) in einer aufgearbeiteten Gülleprobe mit 50 mg TCL/kg, 1: TCL, 2: Bisphenol-a D16 (TR Gülle: 4,8 %)

Tabelle 4.18: Validierungsparameter Triclosan (IUTA)

Substanz	Zusatz [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	WDF [%]
Triclosan	2.000 - 20.000	112 $\pm$ 28

#### 4.2 Bestimmung des Trockenrückstands (TR)

Für die Bestimmung des Trockenrückstandes wurde die feuchte Gülle in einem Tiegel bei einer Ofentemperatur von 105 °C bis zur Massenkonstanz getrocknet. Die Berechnung des Trockenrückstandes erfolgte durch die Subtraktion des Leergewichts des Tiegels von dem Gewicht des Tiegels mit dem trockenen Rückstand. Diese Differenz wurde durch das Feuchtgewicht der Gülle dividiert und anschließend mit dem Faktor 100 multipliziert. Der Trockenrückstand bezieht sich damit prozentual auf die feuchte Masse. Die Bestimmung wurde als Doppelansatz durchgeführt. {Nouws, 1985 #196}

## 4.3 Testorganismen und Anzucht

### 4.3.1 *Bacillus subtilis*

Zur Ausarbeiten der Methodik für die Agardiffusionstests wurden erste Vorversuche wegen der leichteren Handhabbarkeit mit dem aeroben Bakterium *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) durchgeführt. *B. subtilis* ist ein weit verbreiteter grampositiver, stäbchenförmiger, begeißelter, aerob wachsender Endosporenbildner. Die Anzucht erfolgte in einer Übernachtskultur in Standard-I-Boullion (Fa. Merck). Nach dem Ausplattieren auf Plate-Count-Agar (Fa. Roth) und Bebrütung über Nacht, wurde der Bakterienrasen mittels Ringerlösung abgeschwemmt. Diese Lösung wurde nach der Einstellung auf einen definierten Keimgehalt ( $1 \times 10^8$  KBE/mL) als Ausgangslösung für die weiteren Versuche verwendet.

### 4.3.2 *Clostridium thermobutyricum*

Nach ersten orientierenden Versuchen mit dem aeroben Bakterium *Bacillus subtilis* wurde für die Entwicklung des Schnelltests das anaerobe Bakterium *Clostridium thermobutyricum* (*C. thermobutyricum*) ausgewählt, das in gefriergetrockneter Form von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen wurde (DSMZ-Nr. 4928).

*C. thermobutyricum* produziert hauptsächlich Buttersäure. Die wichtigsten Eigenschaften des Bakteriums sind in folgender Aufstellung zusammengefasst {Lamshoft, 2007 #61}:

Temperaturbereich:	26 °C - 61,5 °C
optimale Wachstumstemperatur:	55 °C
pH-Wert Bereich:	5,8 - 9,0
optimaler pH-Wert:	6,8 - 7,1
Verdopplungszeit bei Optimalbedingungen:	45 - 50 min
Form und Verhalten:	stäbchenförmig, beweglich
Länge:	2,0 - 4,5 µm
Durchmesser:	0,9 - 1,1 µm
Sporen:	bildet zentrale - subterminale Sporen
Gramverhalten:	positiv
O <sub>2</sub> -Verhältnis:	strikt anaerob
Stoffwechsel:	saccharolytisch
Hauptgärprodukte:	Buttersäure, Essigsäure, keine Alkohole

### RCM, Reinforced Clostridia Medium

Zur Anzucht von *C. thermobutyricum* wurde das Reinforced Clostridia Medium (RCM) verwendet. Die Medienzusammensetzung ist Tabelle 4.19 zu entnehmen. Für die Herstellung von **Reinforced Clostridia Agar (RC-Agar)** erhöht sich die Agarmenge von 0,5 g/L auf 15 g/L.

Tabelle 4.19: Zusammensetzung des Reinforced Clostridia Mediums

Komponente	Einwaage [g/L]
Hefeextrakt	3,0
Pepton (Fleisch)	10,0
Fleischextrakt	10,0
Stärke, wasserlöslich	1,0
Glucose	5,0
L-Cystein	0,5
NaCl	5,0
Natriumacetat	3,0
Agar	0,5
pH 6,8 ± 0,2	

### Sporulationsmedium

Zur Verbesserung der Sporenbildung von *C. thermobutyricum* wurde das Sporulationsmedium nach Haggström und Molin {Lamshoft, 2007 #61} verwendet, dessen Zusammensetzung Tabelle 4.20 zu entnehmen ist.

Tabelle 4.20: Zusammensetzung des Sporulationsmediums nach Haggström und Molin {Alexander, 2004 #212}

Komponente	Einwaage [g/L]
Stärke, wasserlöslich	40,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,75
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,40
NH <sub>4</sub> Cl	0,80
Hefeextrakt	1,00
Pepton (Fleisch)	1,00
Spurenelementlösung (Tabelle 4.21)	1 mL/L
pH 6,5	

Tabelle 4.21: Zusammensetzung der Spurenelementlösung für das Sporulationsmedium

Komponente	Einwaage [g/L]
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	7,30
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,09
FeCl <sub>3</sub>	6,00
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,85
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,08
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,09

pH 6,5

### 4.3.3 Keimzahlbestimmung

Um abschätzen zu können, wie gut die Bakterien anwachsen und in welcher Menge sie im Medium vorhanden sind, gibt es die Möglichkeit der Keimzahlbestimmung, bei der die koloniebildenden Einheiten (KBE) quantitativ mit Hilfe des Spatelplattenverfahrens (Abbildung 4.8) bestimmt werden. Von der zu bestimmenden Bakteriensuspension wurde dafür eine Verdünnungsreihe (Verdünnung bis 1 : 1.000.000) mit steriler physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Von den homogen durchmischten Verdünnungen wurden jeweils 0,1 mL auf eine RC-Agarplatte pipettiert und mit einem Drigalskispatel gleichmäßig verstrichen.

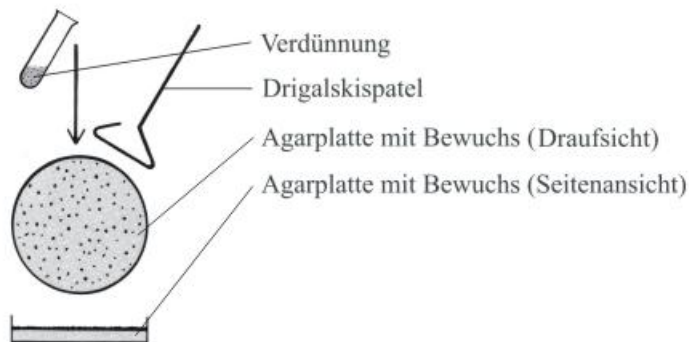


Abbildung 4.8: Schematische Darstellung des Spatelplattenverfahrens {Schl, #0}

Pro Verdünnungsstufe wurde mindestens eine Zweifachbestimmung durchgeführt. Nach der Beimpfung der Platten und der anaeroben Bebrütung von 24 bis 48 Stunden im Brutschrank bei 55 °C erfolgte die Auszählung der KBE auf den Platten. Durch die Multiplikation des Auszählungsergebnisses mit der Verdünnungsstufe wird das Ergebnis in „KBE/mL“ erhalten. Für die Bestimmung der Sporenanzahl musste die Bakteriensuspension zuvor pasteurisiert werden. Nach der Pasteurisierung erfolgte die Bestimmung der Sporenanzahl analog zu der Bestimmung der Gesamtkeimzahl.

#### 4.4 Agardiffusionstests

Für Vorversuche zur Untersuchung der Hemmwirkung der verschiedenen Antibiotika wurden Agardiffusionstest in Anlehnung an den Dreiplattentest aus der allgemeinen Verwaltungsvorschrift über die Durchführung der amtlichen Untersuchungen nach dem Fleischhygienegesetz durchgeführt. Der Agardiffusionstest wurde unter Verwendung von Testblättchen aus Filterpapier durchgeführt, die mit einer definierten Menge eines Hemmstoffs beschickt wurden. Diese Testblättchen wurden auf einen homogen mit *B. subtilis* oder *C. thermobutyricum* vermischten Nähragar aufgelegt. Für die Herstellung der Bakterien-Nähragar-Platten wurde 1 mL der entsprechenden Bakteriengebrauchslösung in eine sterile Petrischale gegeben und für *B. subtilis* mit 20 mL Fleischpepton-Agar (Tabelle 4.22) bzw. für *C. thermobutyricum* mit 30 mL RC-Agar übergossen und gut vermischt.

Tabelle 4.22: Zusammensetzung des Fleischpepton-Agars

Komponente	Einwaage [g/L]
Fleischpepton	3,45
Caseinpepton	3,45
NaCl	5,1
Agar	13,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 %

pH 5 – 8

Die abgekühlten und ausgehärteten Platten können im Kühlschrank maximal drei bis vier Tage gelagert werden. Durch Diffusion in den Nährboden entstand um das Blättchen herum ein Wirkstoffgradient. Bestand eine hemmende Wirkung, konnten die Bakterien im Bereich dieses Wirkstoffgradienten nicht wachsen, es bildete sich ein sogenannter Hemmhof (Abbildung 4.9). Der Durchmesser des Hemmhofes dient als Maß für die Stärke der Hemmung und kann zum Vergleich von verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen herangezogen werden.

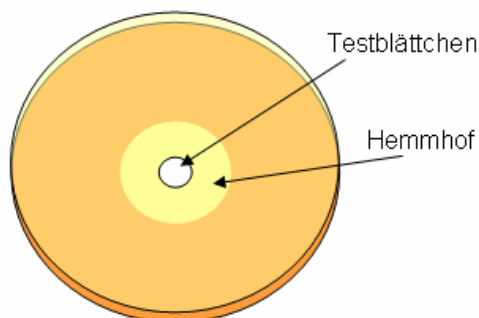
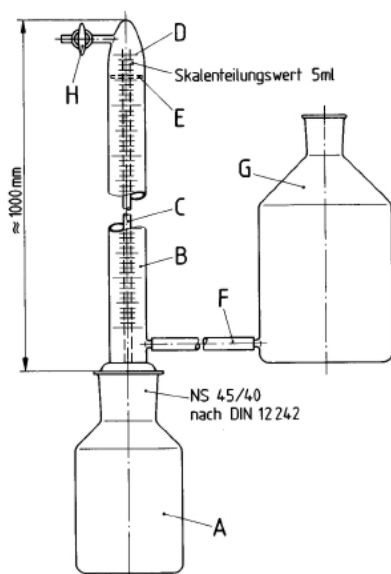


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung zum Agardiffusionstest



## 4.5 Gärtests

Für die Entwicklung eines geeigneten Testsystems muss zunächst die Dosis-Wirkungs-Beziehung der Hemmstoffe in der Gülle-Matrix untersucht werden. Dies erfolgt mittels verschiedener Gärtests (in Anlehnung an DIN 38 414 {Schl, #0} unter anaeroben Bedingungen und einer Laufzeit von mindestens 28 Tagen. Der Aufbau eines Standardgärtests ist in Abbildung 4.10 zu sehen. Das dort dargestellte Eudiometerrohr hat ein Volumen von 400 mL und die Sperrflüssigkeit besteht aus 20 %iger NaCl-Lösung mit 0,5 % Citronensäure und Methylorange-Indikator.



- A Standflasche mit Schlammprobe, Inhalt 500 ml, z. B. Standflasche DIN 12 039 – W 500
- B Eudiometerrohr, Inhalt 300 bis 400 ml, Durchmesser 30 bis 35 mm, Skalenteilungswert 5 ml
- C Verbindungsrohr, Durchmesser etwa 6 mm
- D Nullmarke
- E Haltestifte bzw. Abstandhalter oder Lochverbindung zwischen Mantel des Eudiometerrohres und Verbindungsrohr
- F Schlauchverbindung
- G Niveaugefäß, Inhalt min. 750 ml, z. B. Stutzenflasche DIN 12 037 – K 1
- H Einweg-Kegelhahn, z. B. Küken DIN 12 541 – EM 3

Abbildung 4.10: Schematischer Aufbau eines Gärtestansatzes

Aufbauend auf dem Standardgärtest sind in diesem Forschungsprojekt zwei verschiedene Verfahrensvarianten entwickelt und optimiert worden:

- Gärtests mit Eudiometer (500 mL Gefäße mit Eudiometern zur Gasvolumenmessung)
- Gärtests im Fermenter (5 L Fermenter mit Methansensoren und Milligascounter)

Das gebildete Biogasvolumen wurde entweder mit einem Eudiometer oder mit einem Milligascounter gemessen. Die Methankonzentration konnte im Fermenter mit Hilfe von Infrarot-

sensoren bestimmt werden. Die Analytik der Proben aus dem Gärtest mit Eudiometer erfolgte vor Versuchsbeginn und nach Versuchende. Aus dem Fermenter wurde einmal pro Woche eine Probe zur Substananalytik gezogen.

Die Hemmstoffe wurden in der entsprechenden Menge abgewogen, in VE-Wasser gelöst und mit frischer Schweinegülle (Lagerung höchstens drei Tage nach Abholung vom Bauernhof) vermischt. Zum Animpfen der Versuchsreihe kam der Fermenterinhalt aus immer derselben Biogasanlage zum Einsatz (10 % bezogen auf das Gesamtgewicht des Versuchsansatzes). Als Blindwert wurde ein Gärtest mit undotierter Gülle angesetzt. Alle Versuche bestanden aus Doppelt- oder Dreifachansätzen.

#### 4.5.1 Gärtests mit Eudiometer

Die Durchführung der Gärtests mittels Eudiometer erfolgte in gasdichten Glasgefäßen (500 mL) mit aufgesetztem Eudiometer zur Gasmengenmessung (Abbildung 4.11). Die Versuchsansätze mit dem Gesamtgewicht von 500 g setzten sich wie folgt zusammen: 100 g Schweinegülle, 50 g Fermenterinhalt aus einer Biogasanlage und 350 g VE-Wasser. Der jeweilige Hemmstoff wurde in der zu untersuchenden Konzentration vorgelöst und zugegeben. Die Gärgefäße wurden für die Dauer des Versuches entweder in einem Klimaraum oder Wasserbad temperiert (35° C). Die Hemmwirkung konnte mittels der Differenz der entstehenden Gasmengen dargestellt werden. Während der Laufzeit des Versuches wurden mehrmals in der Woche Umgebungstemperatur, die entstandene Gasmenge und Luftdruck aufgezeichnet. Anhand dieser Daten erfolgte die zur Auswertung notwendige Umrechnung auf Normbedingungen.



Abbildung 4.11: 500 mL Gefäße mit Eudiometern (links: UMSICHT, rechts: IUTA)

#### 4.5.2 Gärtests im 5-L-Fermenter

Die Gärtests im 5-L-Maßstab wurden parallel in zwei Fermentern durchgeführt (Abbildung 4.12). Für einen Versuchsansatz wurden ca. 4 kg Gülle, unter Zusatz von 10 % Fermenterinhalt einer Biogasanlage (bezogen auf die Gesamtmenge) eingesetzt. Die Zudosierung der jeweiligen Hemmstoffe erfolgte als Feststoff oder als Lösung. Der Behälter ist gasdicht, bietet die Möglichkeit zur Temperierung und zur Überwachung von Methan über Sensoren sowie eine Aufzeichnung der entstehenden Gasmenge (Milligascounter). Die Daten wurden online aufgezeichnet und konnten über einen angeschlossenen PC ausgewertet und dargestellt werden. Die Versuche mit den 5-L-Fermentern wurden nur qualitativ ausgewertet. Dieser Versuchsaufbau eignet sich sehr gut zu der Aussage, ob eine Hemmwirkung vorliegt oder nicht, eine Quantifizierung der Messdaten ist jedoch schwierig.

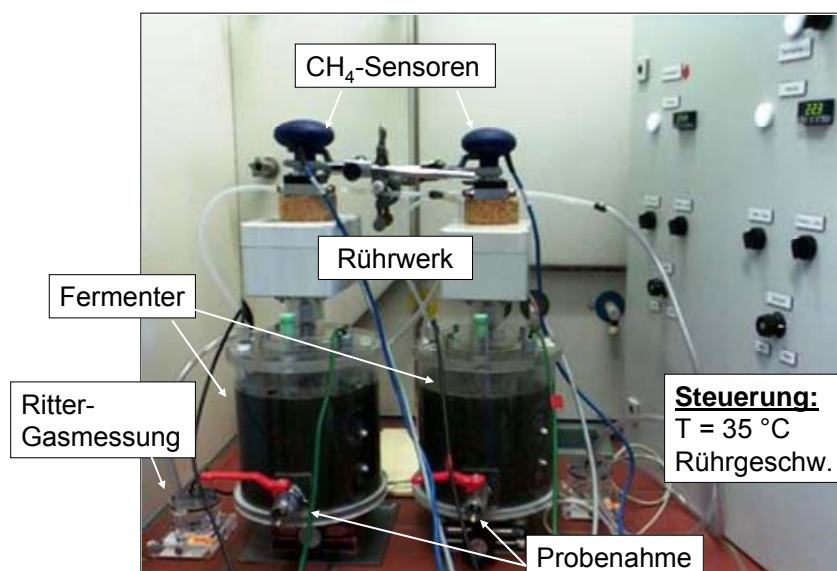


Abbildung 4.12: 5 Liter Fermenter mit Milligascountern und Methan-Sensoren (IUTA)

#### 4.6 Brillantschwarzreduktionstest

Für den Vergleich des im Rahmen dieses Forschungsvorhabens entwickelten Hemmstofftests wurden dotierte Gülleproben mit dem Brillantschwarzreduktionstest (BRT) mit und ohne Vordiffusion zur Milchanalytik von der Firma Analytik in Milch Produktions- und Vertriebs-GmbH (AiM) untersucht. Nachfolgend sind die zur Versuchsdurchführung nötigen Schritte aufgeführt:

- 1) Die benötigte Anzahl Testplatten herrichten, bzw. die benötigte Anzahl Streifen entnehmen.
- 2) Abdeckfolie von den Platten / Streifen abziehen.
- 3) Jeweils 0,1 ml der Probe in eine Kavität pipettieren (Doppelansatz).

- 4) Für jede Probe eine neue Pipettenspitze verwenden.
  - 5) 0,1 ml der Negativ-Kontrolle (Hemmstofffreie Milch) in eine Kavität pipettieren.
  - 6) 0,1 ml der Positiv-Kontrolle (Penicillin G Standard) in eine Kavität pipettieren.
- Nur bei Test mit Vordiffusion:
- Die Proben eine Stunde im Kühlschrank eindiffundieren lassen.
  - Die Platte / Streifen gründlich mit Leitungswasser spülen.
- 7) Die Platte / Streifen mit der Klebefolie fest verschließen.
  - 8) Die Platte / Streifen im Thermoblock (Aerne Analytik GmbH, Typ 5NOB/A) bei 65 °C bebrüten bis die Kavität mit der Negativ-Kontrolle vollständig nach gelb entfärbt ist (ca. 2:30 h +/- 15 min).

Eine korrekte Auswertung kann grundsätzlich nur dann erfolgen, wenn auf der Testplatte bzw. Streifenplatte mindestens eine Positiv- und Negativ-Kontrolle mitgeführt wurden und diese korrekt reagiert haben. Die Auswertung der Testreaktionen erfolgt an der Plattenunterseite. Alle Reaktionssysteme, die einen Farbton aufweisen, der eindeutig von dem Farbton der Negativ-Kontrolle unterscheidbar ist, werden als positiv bzw. verdächtig bezeichnet. In Abbildung 4.13 ist das Beispielfoto einer bebrüteten Platte inkl. Auswertung dargestellt.

Für die Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle des BRT sollten hemmstofffreie Milch (Negativ-Kontrolle) bzw. ein Penicillin G Standard (Positiv-Kontrolle) mitgeführt werden.

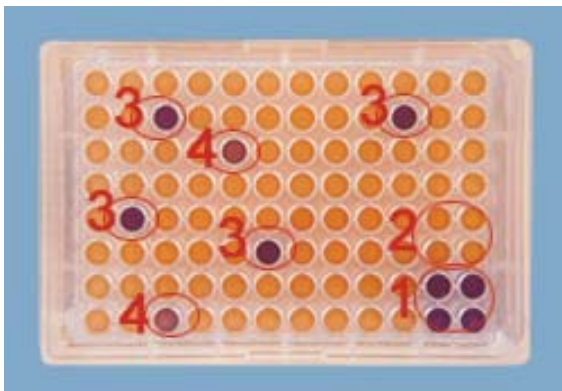


Abbildung 4.13: Foto eines BRTs (1. Positiv-Kontrolle (vierfach Ansatz), 2. Negativ-Kontrolle (vierfach Ansatz), 3. Positive Proben, 4. Verdächtige Probe)

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Auswahl der Hemmstoffe

Zu Beginn des Forschungsvorhabens wurde in Zusammenarbeit mit dem Projektbegleitenden Ausschuss eine Liste der am häufigsten verwendeten potenziellen Hemmstoffe erstellt:

Antibiotika:

- Sulfonamide (Sulfadiazin, Sulfadimethoxin, Sulfamerazin, Sulfamethazin, Sulfamethoxazol, Sulfathiazol, Trimethoprim)
- Tetracycline (Doxycyclin, Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin)
- Tylosin Tartrate
- Neomycin (Geflügel)
- Penicilline (Amoxicillin, Ampicillin, Penicillin G)
- Colistin
- Florfenicol
- Linomycin

Desinfektionsmittel:

- Triclosan
- Hexachlophen
- Nopretisan
- Tacit
- Lysovet
- Alzogur
- quartäre Ammoniumverbindungen

Aufgrund der Verbrauchsmengen und des hauptsächlichlichen Einsatzes von Schweine- und Rindergülle wurden aus der Gruppe der Antibiotika **Sulfonamide**, **Tetracycline** sowie **Penicilline** für erste Gärtests und Stabilitätsversuche ausgewählt. Aufgrund des in Vorversuchen festgestellten schnellen Abbaus der Penicilline (siehe Kapitel 5.3) wurde diese Substanzgruppe bei den weiterführenden Untersuchungen nicht berücksichtigt. Stellvertretend für die unterschiedlichen Reinigungs- und Desinfektionsmittel wurden **Triclosan** und **quartäre Ammoniumverbindungen** ausgewählt.

## 5.2 Ergebnisse des Ringversuches – Vergleich der Methoden für die Analytik von Sulfonamiden und Tetracyclinen

Für einen Vergleich der etablierten Methoden zur Analytik der Sulfonamide und Tetracycline wurde ein interner Ringversuch bei den am Forschungsvorhaben beteiligten Instituten durchgeführt. Die Gülleproben (reale und dotierte Güllen sowie Blindwerte) wurden bei TiHo und IUTA mit den in Kapitel 4.1 beschriebenen Methoden untersucht. Dies ermöglicht einen Vergleich der verschiedenen Analysenmethoden hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit und Genauigkeit.

Für die Sulfonamide Sulfadiazin und Sulfamethazin wurden die Methoden mittels HPLC-ESI-Ion-Trap gegenüber der Analytik mit HPLC-ACPI-MS/MS bzw. Hochtemperatur HPLC (HT-HPLC-ESI-MS/MS) verglichen (Tabellen 5.1 und 5.2). Für die Substanzen Tetracyclin, Chlortetracyclin und Oxytetracyclin fand eine Gegenüberstellung der Methoden HPLC-ESI-Ion Trap und HPLC-ESI-MS/MS statt (Tabellen 5.3 bis 5.5).

Die Ion Trap Methode ermöglicht die Identifikation von unbekanntem Substanzen, da ein Fragmentation-Massenspektrum erfasst werden kann. Hierzu ist jedoch eine Basislinientrennung mittels HPLC unabdingbar. Da dies nur durch eine aufwändige Anpassung der HPLC-Methodenparameter möglich ist und teilweise nur durch zwei unterschiedliche Methoden zu realisieren ist, erhöht sich die Analysenzeit im Vergleich zur Methode mittels HPLC-ACPI-MS/MS. Im Gegensatz dazu werden bei der MS/MS-Methode spezifische Massenübergänge zur Identifikation der Analyten herangezogen. Diese Massenübergänge werden durch Vorversuche einmalig bestimmt und können dann bei allen Analysen angewendet werden. Ein Vorteil dieser Messmethode ist, dass die Basislinientrennung wie bei der Ion Trap Methode nicht nötig ist und durch die spezifischen Massenübergänge die Probenmatrix ausgeblendet werden kann, was zu einer erhöhten Empfindlichkeit führt. Bei der Hochtemperatur-HPLC-MS/MS Methode wird die mobile und die stationäre Phase für die Trennung der Substanzen auf Temperaturen von bis zu 90 °C erwärmt. Durch die niedrigere Viskosität der mobilen Phase bei höheren Temperaturen erniedrigt sich der Säulengegendruck. Dadurch können höhere Flussraten angewendet werden, was zu einer Verkürzung der Analysenzeiten führt. Zusätzlich werden die Substanzpeaks schmaler und höher, was zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit bei der Detektion führt. Des Weiteren wird durch den Temperatureinfluss die Selektivität der Trennung beeinflusst. Dieses Verhalten wird genutzt, um eine verbesserte Trennung der Analyten auf der Säule zu erhalten. Zusätzlich wird durch die höhere Temperatur die Polarität der mobilen Phase herabgesetzt, was dazu führt, dass der Anteil an organischem Lösungsmittel in der mobilen Phase herabgesetzt werden kann. Die höhere Flussrate und der niedrigere organische Lösemittelanteil erschweren jedoch die Ioni-

sierung mittels Electrospray-Ionisation, was zu einer geringeren Ionenausbeute, und damit auch zu einer höheren Nachweisgrenze führt. Für die HT-HPLC-MS/MS Messungen wurden die gleichen Messparameter wie für die HPLC-MS/MS Methode angewendet. Lediglich die Verweilzeit wurde auf Grund der schmalen Peakbreiten von 60 ms auf 5 ms herabgesetzt und die Ionisierungstemperatur wurde auf Grund der höheren Flussrate auf 750 °C heraufgesetzt. Die Electrospray-Ionenquelle wurde anstelle der APCI-Quelle eingesetzt, da die Ionisierung der Analyten mit der ESI-Quelle eine höhere Ionenausbeute ergab. Die Nachweisgrenzen (Tabelle 5.1) liegen bei den Tetracyclinen mit der Ion Trap Methode niedriger als bei der TripleQuad Bestimmung (bessere Empfindlichkeit der Ion Trap Methode). Für Sulfamethazin liegen die Nachweisgrenzen für beide Methoden bei 0,005 bzw 0,006 mg/kg, sind also ungefähr gleich. Bei Sulfadiazin kann mit der HPLC-MS/MS Methode im Gegensatz zu den Tetracyclinen eine niedrigere Nachweisgrenze erreicht werden.

Tabelle 5.1: Nachweisgrenzen der Methoden im Ringversuch

	<b>HPLC-ESI-Ion trap</b>	<b>HPLC-APCI-MS/MS</b>	<b>HT-HPLC-ESI-MS/MS</b>
Sulfadiazin	0,02	0,004	1,0
Sulfamethazin	0,005	0,006	0,5
Tetracyclin (einschließlich Epimere)	0,02	0,3	-
Chlortetracyclin (einschließlich Epimere)	0,02	0,2	-
Oxytetracyclin	0,02	0,2	-

Tabelle 5.2: Ergebnisse des Ringversuches für Sulfadiazin

<b>Sulfadiazin [mg/kg Gülle]</b>			
<b>Probe</b>	<b>HPLC-ESI-Ion trap</b>	<b>HPLC-APCI-MS/MS</b>	<b>HT-HPLC-ESI-MS/MS</b>
	<b>TiHo</b>	<b>IUTA</b>	<b>IUTA</b>
1	0,04	0,014	< NWG
2	0,68	0,33	2,3
3	0,05	0,028	< NWG
4	0,14	0,070	< NWG
5	< NWG	< NWG	< NWG
6	< NWG	< NWG	< NWG
7	< NWG	< NWG	< NWG
8	< NWG	0,004	< NWG
9	5,21	2,3	< NWG
10	< NWG	< NWG	< NWG
11	7,90	3,4	9,5
12	< NWG	0,004	< NWG
<b>NWG</b>	<b>0,02</b>	<b>0,004</b>	<b>1,0</b>

Tabelle 5.3: Ergebnisse des Ringversuches für Sulfamethazin

<b>Sulfamethazin [mg/kg Gülle]</b>			
<b>Probe</b>	<b>HPLC-ESI-Ion trap</b>	<b>HPLC-APCI-MS/MS</b>	<b>HT-HPLC-ESI-MS/MS</b>
	<b>TiHo</b>	<b>IUTA</b>	<b>IUTA</b>
1	< NWG	< NWG	< NWG
2	< NWG	0,013	< NWG
3	< NWG	< NWG	< NWG
4	0,49	0,47	1,2
5	0,75	0,48	1,2
6	< NWG	< NWG	< NWG
7	< NWG	< NWG	< NWG
8	< NWG	< NWG	< NWG
9	3,1	3,5	< NWG
10	< NWG	< NWG	< NWG
11	4,6	5,2	2,7
12	< NWG	< NWG	< NWG
<b>NWG</b>	<b>0,005</b>	<b>0,006</b>	<b>0,5</b>



Tabelle 5.4: Ergebnisse des Ringversuches für Tetracycline

<b>ges. Tetracyclin (einschließlich Epimere) [mg/kg Gülle]</b>		
<b>Probe</b>	<b>HPLC-ESI-Ion trap</b>	<b>HPLC-ESI-MS/MS</b>
	<b>TiHo</b>	<b>IUTA</b>
1	3,2	1,4
2	94	109
3	2,5	2,8
4	2,1	2,9
5	12	14
6	1,2	9,2
7	0,9	1,2
8	< NWG	< NWG
9	4,9	8,9
10	< NWG	< NWG
11	9,8	35
12	0,08	< NWG
<b>NWG</b>	<b>0,02</b>	<b>0,3</b>

Tabelle 5.5: Ergebnisse des Ringversuches für Chlortetracyclin

<b>ges. Chlortetracyclin (einschließlich Epimere) [mg/kg Gülle]</b>		
<b>Probe</b>	<b>HPLC-ESI-Ion trap</b>	<b>HPLC-ESI-MS/MS</b>
	<b>TiHo</b>	<b>IUTA</b>
1	0,05	< NWG
2	0,09	0,6
3	< NWG	< NWG
4	2,6	3,4
5	0,04	< NWG
6	0,6	6,0
7	< NWG	< NWG
8	< NWG	< NWG
9	0,7	2,6
10	< NWG	< NWG
11	2,9	8,4
12	< NWG	< NWG
<b>NWG</b>	<b>0,02</b>	<b>0,2</b>

Tabelle 5.6: Ergebnisse des Ringversuches für Oxytetracyclin

<b>Oxytetracyclin [mg/kg Gülle]</b>		
<b>Probe</b>	<b>HPLC-ESI-Ion trap TiHo</b>	<b>HPLC-ESI-MS/MS IUTA</b>
1	< NWG	< NWG
2	0,2	0,4
3	< NWG	< NWG
4	0,09	0,3
5	< NWG	< NWG
6	< NWG	< NWG
7	< NWG	< NWG
8	< NWG	< NWG
9	< NWG	< NWG
10	< NWG	< NWG
11	< NWG	< NWG
12	< NWG	< NWG
<i>NWG</i>	<i>0,02</i>	<i>0,2</i>

Die in den Tabellen 5.2 bis 5.6 dargestellten Laborvergleichsuntersuchungen zeigen, dass sowohl für die Sulfonamide als auch für die Tetracycline an beiden Forschungsstellen zur Bewertung der Proben vergleichbare Ergebnisse erhalten werden. Die gerade im unteren Konzentrationsbereich vorkommenden leichten Abweichungen können im Einzelfall auf die Inhomogenität des Probenmaterials und auf Matrixeffekte zurückgeführt werden. Aufgrund der schlechteren Nachweisgrenzen bei der Hochtemperatur HPLC sind die Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchungen nur bei einzelnen Proben vergleichbar. Die teilweise höheren Abweichungen machen nochmals die Komplexität der Proben und den Einfluss auf das Analyseverfahren deutlich. Zur Bewertung der Proben in Hinblick auf den Biogasprozess störende Konzentrationen sind alle drei Methoden sehr gut geeignet. Auch sind mit allen drei Methoden Validierungsuntersuchungen zum entwickelten Hemmstofftest möglich. Zur Feststellung des wahren Wertes wäre die Untersuchung von zertifizierten Referenzmaterialien notwendig. Da für die Matrix Gülle diese Referenzmaterialien nicht zur Verfügung stehen, müssen Messunsicherheiten von 30 bis 95 % beim Vergleich von Analyseergebnissen aus unterschiedlichen Laboratorien bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

### 5.3 Stabilität von Antibiotika in Gülle

Die Langzeituntersuchungen zur Stabilität von Tetracyclinen und Sulfonamiden wurden in Gülleproben durchgeführt, die im Rahmen vorheriger Forschungsprojekte gesammelt und im Kühlraum des Institutes für Lebensmitteltoxikologie (TiHo) seit mehreren Jahren konstant bei 4 °C in dicht verschlossenen PE-Flaschen (quasi anaerob) gelagert wurden. Die Ergebnisse lassen sich aufgrund der vergleichsweise niedrigen Temperaturen nicht unmittelbar auf die Situation in einem landwirtschaftlichen Betrieb übertragen; es sind jedoch eindeutige substanzspezifische Tendenzen erkennbar (siehe Tabelle 5.7 und Abbildungen 5.1 bis 5.4). In diesem Zusammenhang sei noch darauf hingewiesen, dass neben dem Abbau der Substanzen auch eine Adsorption an Güllepartikel erfolgen kann. Ob und durch welche Mechanismen adsorbierte Arzneimittelbestandteile wieder desorbiert werden können, ist derzeit weitestgehend unbekannt. Insofern wurden in den nachfolgenden Tabellen Eliminationsraten berechnet, die sowohl auf Abbau- als auch auf Sorptionsprozessen beruhen können.

In den untersuchten Güllen ist die Stabilität bzw. der analytisch erfassbare Anteil der Tetracycline deutlich höher als im Vergleich zu den Sulfonamiden. In einzelnen Gülleproben ist sogar ein Konzentrationsanstieg des Tetracyclins trotz über fünfjähriger Lagerung nachweisbar. Eine Ursache könnte – wie bereits oben erwähnt – darin begründet liegen, dass an organische Matrixbestandteile adsorbierte Tetracycline nach Abbau des organischen Substrates im Laufe der Zeit wieder frei gesetzt werden.

Sofern eine Ausgangskonzentration an Tetracyclinen vorhanden ist, die größer als 500 µg/kg ist, können in fast allen Proben auch nach 62 Monaten Lagerzeit noch mindestens 30 % wiedergefunden werden. Die Eliminationsrate der Sulfonamide liegt dagegen in der Regel über 75 %. Wie anhand einer mit Standardsubstanzen dotierten Probe (Tabelle 5.8) zu sehen ist, werden auch dotierte Antibiotika in einem vergleichbaren Umfang eliminiert wie die Substanzen, die durch das Tier metabolisiert wurden.

Alle Proben wurden auf vier weitere Sulfonamide und Oxytetracyclin (OTC) überprüft. Während in keiner Probe weitere Sulfonamide detektiert werden konnten (NWG 20 µg/kg), wurden in zwei Proben kleine Mengen OTC nachgewiesen. Probe 3 enthält 220 µg/kg OTC (2. Messung) bzw. 155 µg/kg (3. Messung). Probe 5 enthält 97 µg/kg OTC (2. Messung) bzw. 86 µg/kg (3. Messung).

Tabelle 5.7: Untersuchung zur Langzeit-Stabilität von Tetracyclinen und Sulfonamiden in verschiedenen Gällen (Lagerung im Dunkeln in verschlossenen PE-Flaschen bei 4 °C).

<b>Probe</b>	<b>Nr.</b>	<b>1. Messung [µg/kg]</b>	<b>2. Messung [µg/kg]</b>	<b>3. Messung [µg/kg]</b>
BDF 033 vom 02.05.01	1	06/01 CTC: 90 TC: 3870 SDZ: 340 SMZ: < 50	08/06 CTC: < 50 TC: 2920 SDZ: < 50 SMZ: < 20	11/07 CTC: < 50 TC: 3155 SDZ: < 50 SMZ: < 20
BDF 032 vom 20.02.01	2	06/01 CTC: 1510 TC: 960 SDZ: n. b. SMZ: n. b.	08/06 CTC: 1490 TC: 820 SDZ: < 20 SMZ: < 20	11/07 n.b.
Kälbermastbetrieb vom 02.05.01, Einstal- lung	3	06/01 CTC: < 20 TC: 45312 SDZ: 1100 SMZ: < 20	08/06 CTC: 129 TC: 104823 SDZ: 427 SMZ: < 20	11/07 CTC: 95 TC: 93779 SDZ: 680 SMZ: < 20
Kälbermastbetrieb vom 02.05.01, End- mast	4	06/01 CTC: < 20 TC: 1098 SDZ: 900 SMZ: < 20	08/06 CTC: < 20 TC: 1691 SDZ: < 20 SMZ: < 20	11/07 CTC: TC: 2463 SDZ: < 50 SMZ: < 20
Betrieb Huede	5	06/01 CTC: 3000 TC: 1632 SDZ: 600 SMZ: 2900	08/06 CTC: 2230 TC: 1541 SDZ: 137 SMZ: 608	11/07 CTC: 2561 TC: 2108 SDZ: 142 SMZ: 494
BDF 033 2021B	6	06/01 CTC: 100 TC: 4000 SDZ: n. b. SMZ: n. b.	08/06 CTC: < 50 TC: 6338 SDZ: < 20 SMZ: 634	11/07 CTC: < 50 TC: 11912 SDZ: < 20 SMZ: 753
BDF 032 2001	7	06/01 CTC: 1470 TC: 702 SDZ: n. b. SMZ: n. b.	08/06 CTC: 470 TC: 1007 SDZ: < 20 SMZ: < 20	11/07 CTC: 638 TC: 1168 SDZ: < 20 SMZ: < 20
BDF 033 3053A	8	06/02 CTC: < 20 TC: 1180 SDZ: < 20 SMZ: < 20	08/06 CTC: < 20 TC: 507 SDZ: < 20 SMZ: < 20	11/07 CTC: < 20 TC: 933 SDZ: < 20 SMZ: < 20

\* nur berechnet, wenn Ausgangskonzentration  $\geq 100$  µg/kg; n. b. = nicht bestimmt

Tabelle 5.8: Untersuchung zur Langzeit-Stabilität von Tetracyclinen und Sulfonamiden in einer dotierten Schweinegülle (Lagerung im Dunkeln in verschlossenen PE-Flaschen bei 4°C)

Probe	Nr.	1. Messung [µg/kg]	2. Messung [µg/kg]	3. Messung [µg/kg]
141161 Kontrolle vom 09.04.03	9	04/03 CTC: < 20 TC: < 20 SDZ: < 20 SMZ: < 20	08/06 CTC: < 20 TC: < 20 SDZ: < 20 SMZ: < 20	11/07 CTC: < 20 TC: < 20 SDZ: < 20 SMZ: < 20
09.04.03 ausgebr. (gespikte Probe 141161)	10	04/03 CTC: 8926 TC: 9971 SDZ: 17683 SMZ: 17126	08/06 CTC: 2790 TC: 6951 SDZ: 3396 SMZ: 3094	11/07 CTC: 715 TC: 4860 SDZ: 5214 SMZ: 3054

\* nur berechnet, wenn Ausgangskonzentration  $\geq 100 \mu\text{g/kg}$ ; n. b. = nicht bestimmt

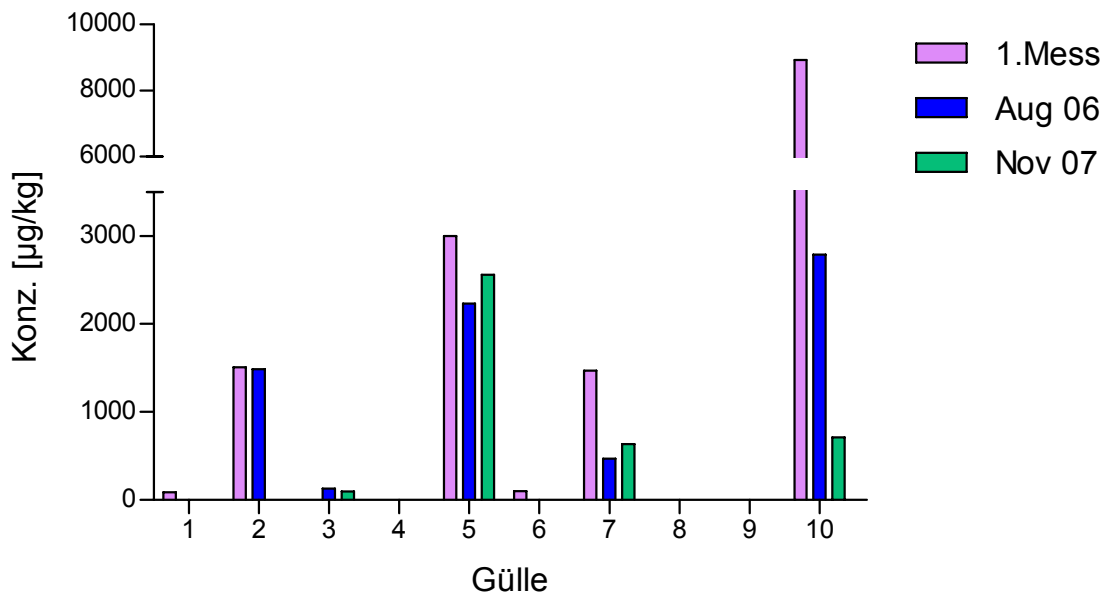


Abbildung 5.1: Stabilität von Chlortetracyclin in verschiedenen Güllen (Gülle 2: keine Messung Nov. 2007)

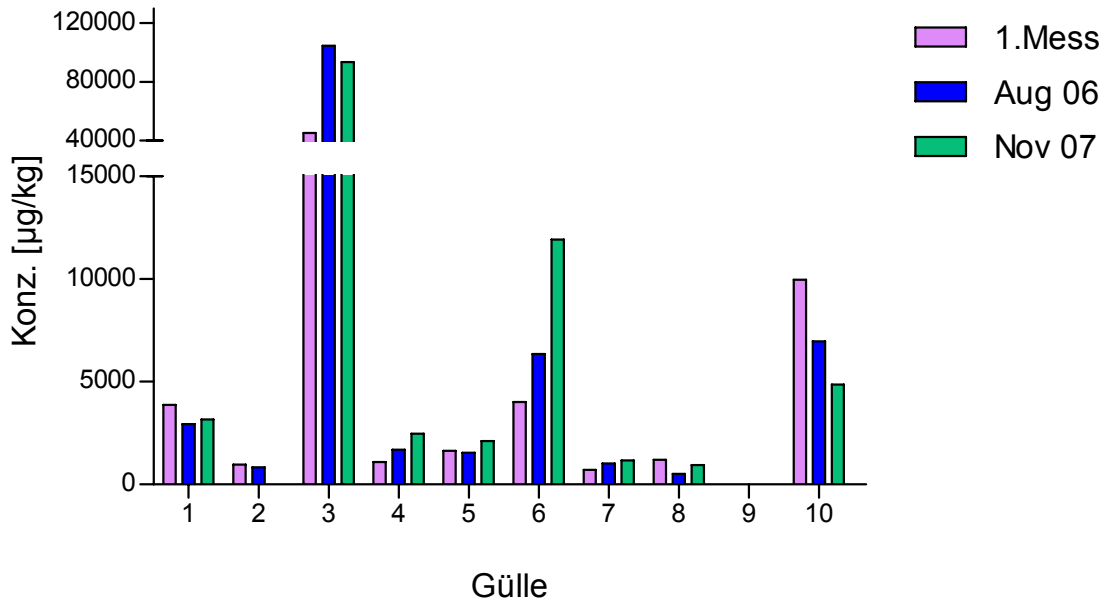


Abbildung 5.2: Stabilität von Tetracyclin in verschiedenen Güllen (Gülle 2: keine Messung Nov. 2007)

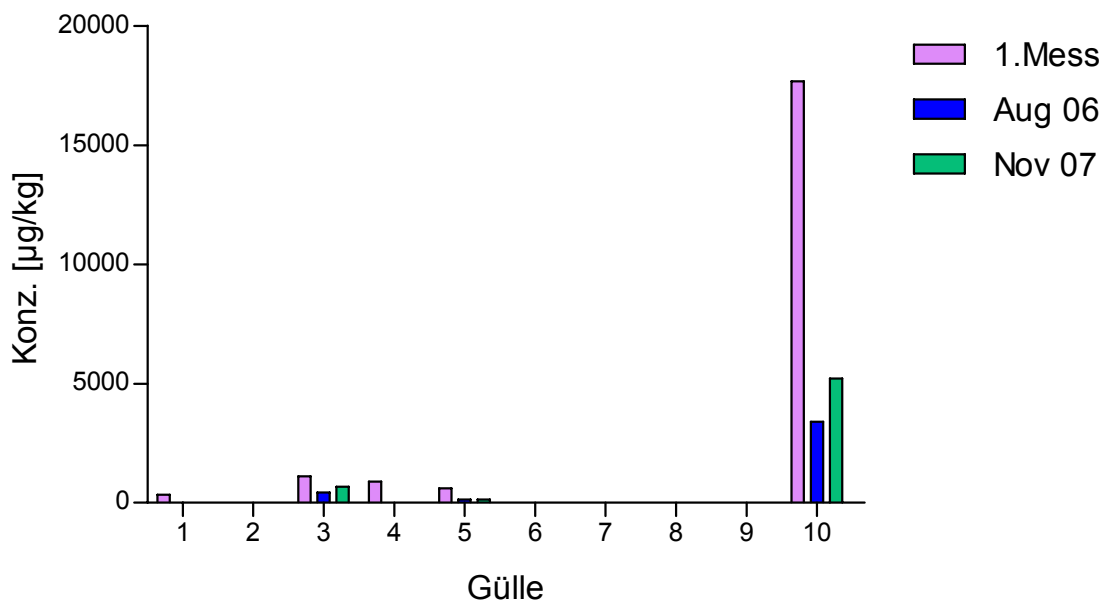


Abbildung 5.3: Stabilität von Sulfadiazin in verschiedenen Güllen (Gülle 2: keine Messung Nov. 2007, Gülle 2, 6 u. 7: keine 1. Messung)

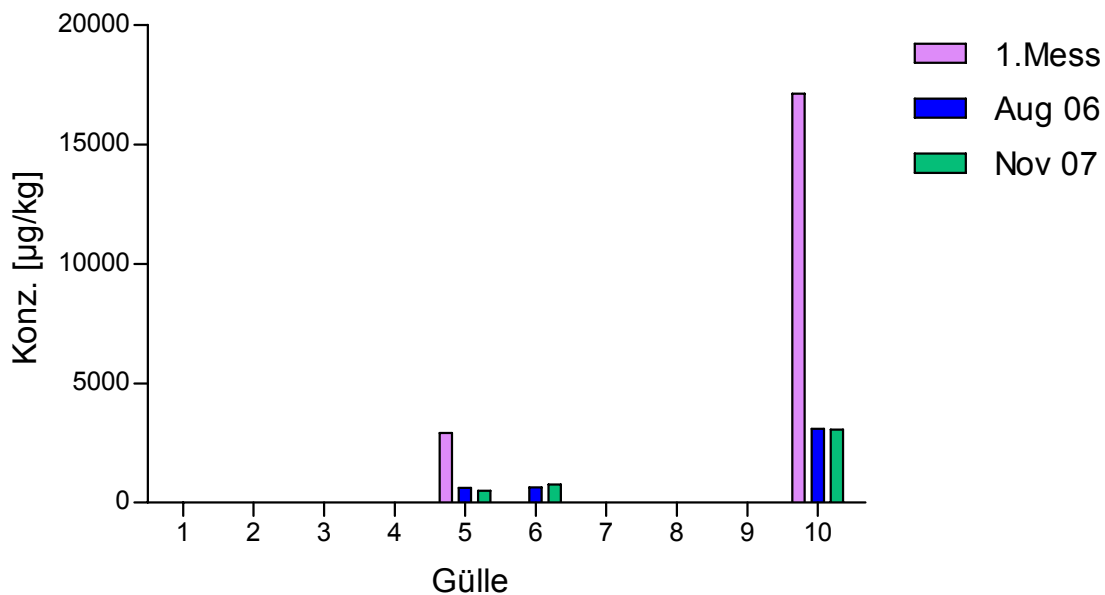


Abbildung 5.4: Stabilität von Sulfamethazin in verschiedenen Gülle (Gülle 2: keine Messung Nov. 2007, Gülle 2, 6 u. 7: keine 1. Messung)

Zusätzlich wurde am IUTA für die Sulfonamide eine dotierte Gülleprobe (8,9 bis 9,2 mg/kg Frischgülle je Wirkstoff) aufgeteilt und die Stabilität der Substanzen bei zwei verschiedenen Lagerungstemperaturen (4 °C und 25 °C) untersucht. Nach einer intensiven Beprobungsphase in den ersten vier Wochen wurden zwei Untersuchungen nach 408 und 476 Tagen sowie eine abschließende Untersuchung nach weiteren sechs Jahren durchgeführt. Die in Abbildung 5.5 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass TMP bei 25 °C innerhalb von drei Tagen sehr schnell abgebaut wird. Die Temperatur hat starken Einfluss auf das Abbauverhalten von TMP, da bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C nach 476 Tagen TMP noch nachgewiesen werden kann. Generell kann, mit Ausnahme von SMZ, bei allen untersuchten Wirkstoffen bei 4 °C ein verzögerter Abbau beobachtet werden. Unter diesen Bedingungen ist bis auf TMP ein Nachweis aller eingesetzten Substanzen nach etwa 6 Jahren noch möglich.

Bei SDZ, AcSDZ und SMZ ist bei 25 °C in den ersten 29 Tagen ein leichter Abbau von 10 bis 35 % zu beobachten. Die bei 4 °C gelagerten Proben sind in diesem Zeitraum stabil. Nach über 400 Tagen Lagerung wurden bei 25 °C bis auf SMZ alle eingesetzten Substanzen größtenteils abgebaut. Jedoch können nach sechs Jahren noch Rückstände von SDZ und SMZ nachgewiesen werden. Bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C können die Sulfonamide und der Acetyl-Metabolit zu ca. 40 % wiedergefunden werden. Bei SMZ ist kein Einfluss der Lagerungstemperatur feststellbar. Dies bestätigen erste Untersuchungsergebnisse (siehe Kapitel 3), die andeuten, dass SDZ beim Fermentationsprozess von den einge-

setzten Mischkulturen abgebaut werden kann und das sich durch zwei Methylgruppen unterscheidende SMZ nicht.

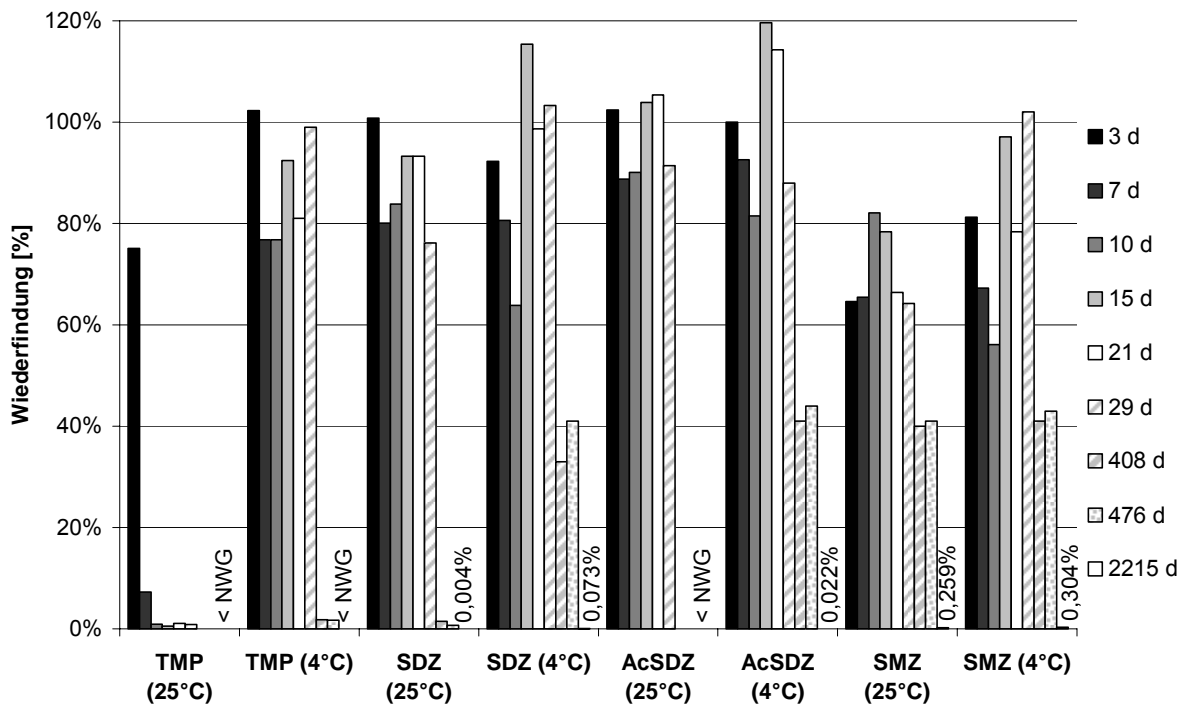


Abbildung 5.5: Stabilität von Sulfonamiden, einem acetylierten Sulfonamid und TMP in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur (4° C und 25° C)

In Vorversuchen wurde zudem die Stabilität von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Penicilline und Cephalosporine) in Gülle untersucht. Dazu wurde eine HPLC-ESI-MS/MS Methode entwickelt, die die parallele Analytik von Amoxicillin, Ampicillin, Penicillin G und V, Oxacillin, Cloxacillin, Nafcillin, Dicloxacillin, Cefazolin und Cefoperazon ermöglicht. Schon nach drei Tagen lichtgeschützter Lagerung von dotierten Gülleproben bei 4° C konnte keiner der oben genannten Wirkstoffe nachgewiesen werden. In Abstimmung mit dem Projektbegleitenden Ausschuss wurde auf die Durchführung von Stabilitätsversuchen unter Einbeziehung unterschiedlicher Lagerungs- und Belüftungsbedingungen verzichtet, da eine Relevanz für die praktische Anwendung nicht zu erwarten ist. In der Praxis werden Gärsubstrate, insbesondere Gülle weitestgehend unter anaeroben Bedingungen in geschlossenen Behältern gelagert. Eine Belüftung von Substraten findet somit unter realen Bedingungen nicht statt und ist aus ökonomischen Gründen auch in Zukunft nicht möglich. Im Gegensatz dazu können jedoch durch Witterungseinflüsse oder Wechsel der Jahreszeiten große Temperaturschwankungen auftreten, weshalb der Einfluss der Lagerungstemperatur einen größeren Bezug zur Praxis bietet, und die Untersuchungen zur Langzeitstabilität auf diesen Parameter konzentriert wurden.



## **5.4 Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Hemmstoffen mittels Gärtests**

Zur Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Beziehung, sind Gärtests wie in Kapitel 4.5 beschrieben, durchgeführt worden. Zur Quantifizierung der Hemmwirkung wurde die gesamte Gasbildung herangezogen. Zusätzlich erfolgte für ausgewählte Versuche die Analytik der Gaszusammensetzung. Die Grenze zur Bestimmung der Schwellenwerte, ab denen eine signifikante Hemmung im Biogasprozess zu erwarten ist, wurde bei einer 15-prozentigen Hemmung festgelegt.

Als Hemmstoffe wurden die Antibiotika Amoxicillin, Chlortetracyclin (CTC), Oxytetracyclin (OTC), Tetracyclin (TC), Sulfadiazin (SDZ) und Sulfamethazin (SMZ) ausgewählt. Die Versuche mit SMZ und SDZ wurden in Kombination mit Trimethoprim (TMP) durchgeführt, da TMP als Synergist in Sulfonamid-haltigen Arzneistoffen enthalten ist. Für den Bereich der Desinfektionsmittel wurden zum einen drei verschiedene quartäre Ammoniumverbindungen (QAV) und zum anderen das weit verbreitete Desinfektionsmittel Triclosan (TCL) gewählt. Weiterhin wurden Versuche mit dem zur Klauendesinfektion eingesetzten Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ ) durchgeführt.

Die Versuche in den 500-mL-Ansätzen (Gärtests mit Eudiometer) wurden mit einem ca. 20-prozentigen Gülleanteil, die Versuche im 5-L-Fermenter hingegen mit unverdünnter Gülle durchgeführt. Alle im Folgenden dargestellten Ergebnisse sowie die Konzentrationsangaben beziehen sich auf den Gülleanteil im Versuchsansatz. Da die Güllen in ihrem Trockenrückstandsgehalt stark schwanken, werden zusätzlich zu den Ergebnissen (in mg/kg Frischgülle) die Trockenrückstände der jeweiligen verwendeten Güllen angegeben.

### **5.4.1 Hemmwirkung von Amoxicillin**

Die Hemmwirkung von Amoxicillin wurde bei den Konzentrationen 250, 125 und 62,5 mg/kg untersucht (Abbildung 5.6). Bei allen drei Konzentrationen konnte keine Hemmwirkung festgestellt werden. Ein Schwellenwert konnte nicht bestimmt werden. Der TR der verwendeten Gülle lag bei 9 %.

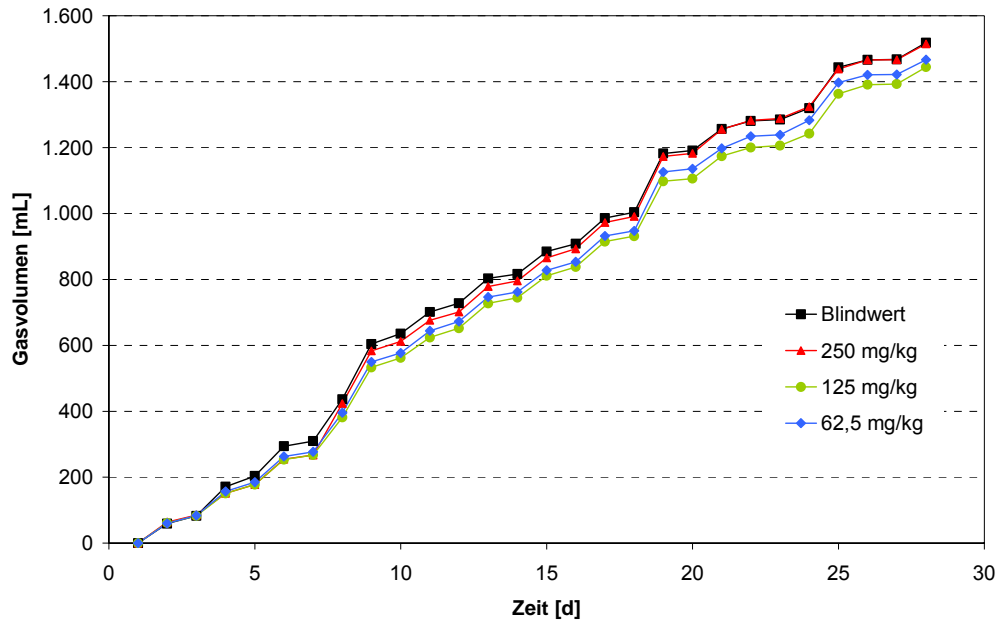


Abbildung 5.6: Gasbildung von verschiedenen Amoxicillin-Konzentrationen (Gärtests mit Eudiometer)

### 5.4.2 Hemmwirkung von Chlortetracyclin (CTC)

In Abbildung 5.7 ist die Hemmwirkung verschiedener CTC-Konzentrationen dargestellt. Schon ab einer Konzentration von 125 mg/kg ist eine 10-prozentige Hemmung festzustellen. Bei einer Konzentration von 1250 mg/kg liegt die Hemmwirkung bei fast 90 %. Der Schwellenwert liegt für CTC in dem Bereich von 125 - 250 mg/kg.

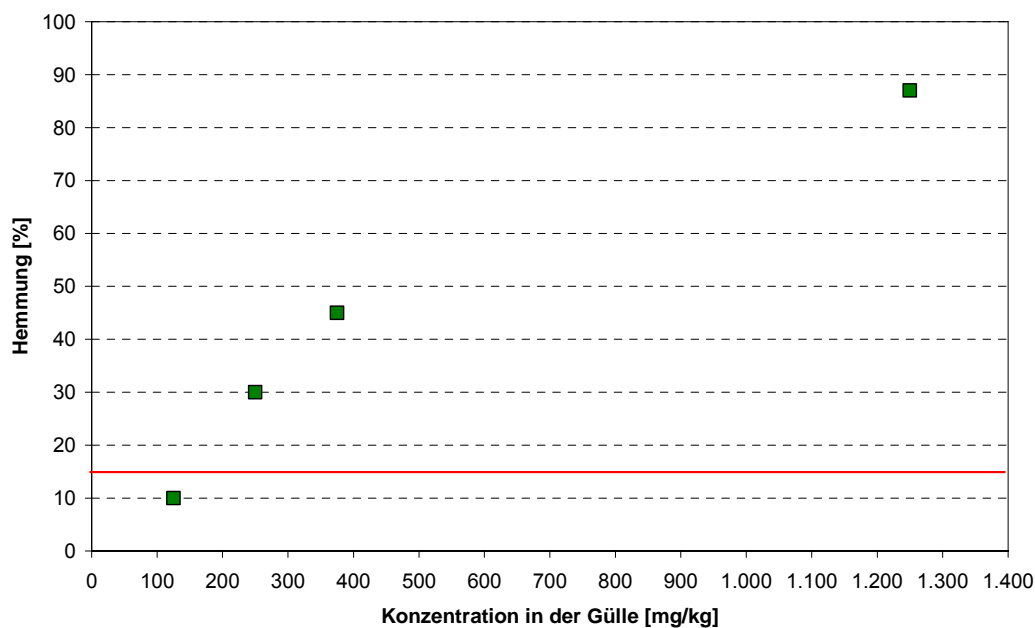


Abbildung 5.7: Hemmwirkung von verschiedenen CTC-Konzentrationen (Gärtests mit Eudiometer)

### 5.4.3 Hemmwirkung von Tetracyclin (TC)

Die Ergebnisse der verschiedenen Versuche zur Hemmwirkung von TC in Abbildung 5.8 zeigen einen linearen Verlauf, wenn die 20-prozentige Hemmung bei 62,5 mg/kg als Ausreißer betrachtet wird. Bei 125 mg/kg kommt es zu einer 11-prozentigen Hemmung der Gasproduktion. Die nächste betrachtete Konzentration von 250 mg/kg führt zu einer Hemmung von 29 %. Der Schwellenwert liegt für TC in dem Bereich von 125 - 250 mg/kg.

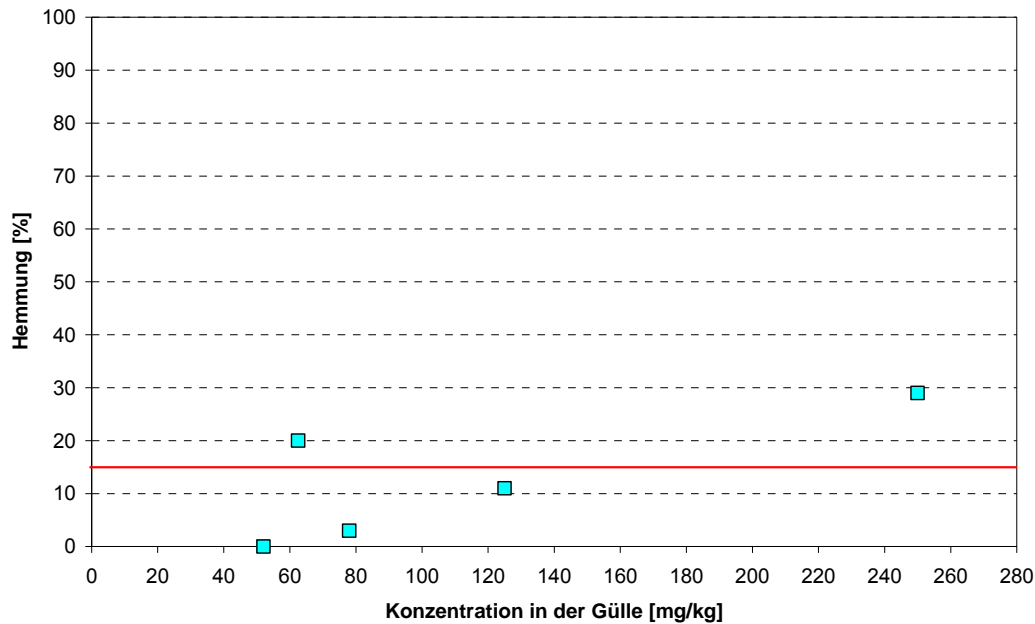


Abbildung 5.8: Hemmwirkung von verschiedenen TC-Konzentrationen (Gärtests mit Eudiometer)

### 5.4.4 Hemmwirkung von Oxytetracyclin (OTC)

Für die Bestimmung der Hemmwirkung von OTC liegen nur drei Versuchswerte vor (Abbildung 5.9). Bei 250 mg/kg ist keine Hemmwirkung festzustellen. Eine Konzentration von 500 mg/kg führt zu einer Hemmung von 39 %. Der Schwellenwert liegt für OTC in dem Bereich von 250 - 500 mg/kg.

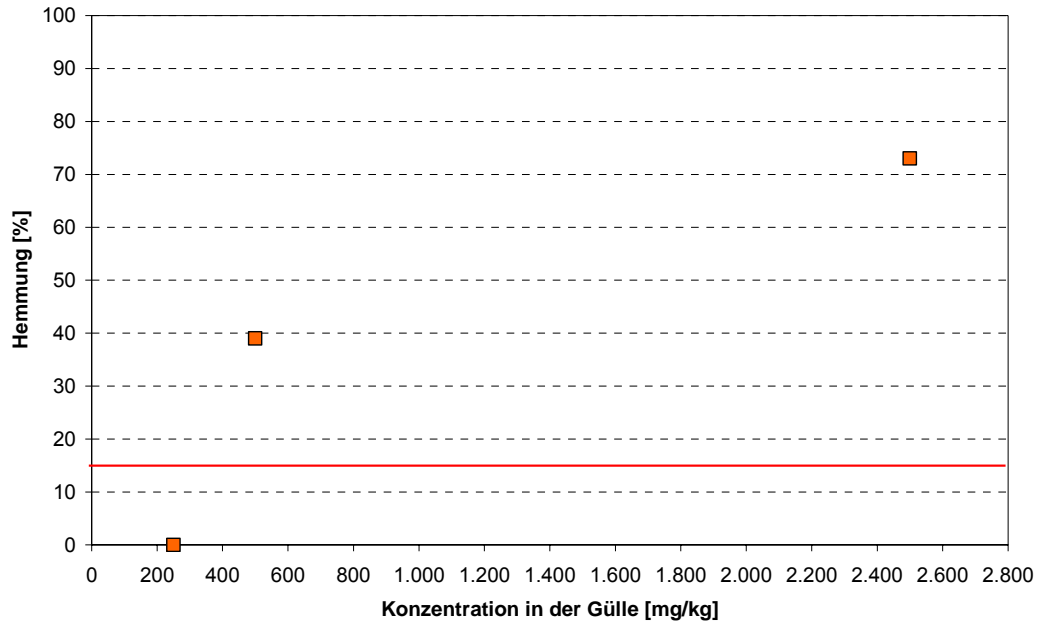


Abbildung 5.9: Hemmwirkung von verschiedenen OTC-Konzentrationen (Gärtests mit Eudiometer)

#### 5.4.5 Hemmwirkung von Sulfadiazin (SDZ) und Trimethoprim (TMP)

In Abbildung 5.10 ist die Hemmwirkung verschiedener SDZ-Konzentrationen dargestellt. Erst bei 1.000 mg/kg ist eine 20-prozentige Hemmung festzustellen. Der Schwellenwert liegt somit für SDZ in dem Bereich von 750 – 1.000 mg/kg.

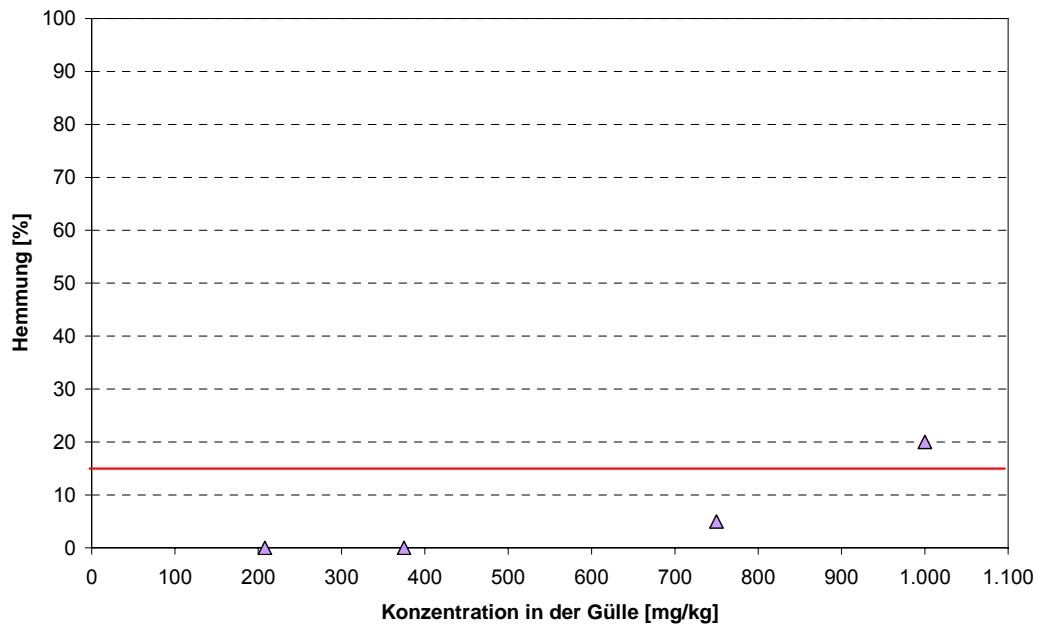


Abbildung 5.10: Hemmwirkung von verschiedenen SDZ-Konzentrationen (Gärtests mit Eudiometer)

Zusätzlich zu den Gärtests mit Eudiometer im 500-mL-Maßstab wurden zur Hemmwirkung von Sulfadiazin Versuche im 5-Liter-Fermenter durchgeführt. Bei einem Versuch mit der

Dotierung von 278 mg SDZ und 55,6 mg TMP pro kg Gülle konnte analog zu den Gärtests mit Eudiometer keine Hemmwirkung festgestellt werden.

In einem weiteren Versuch wurden im 5-L-Fermenter 1.000 mg/kg SDZ und 200 mg/kg TMP zudosiert. Auch hier ist wie bei den Gärtests mit Eudiometer, die mit der gleichen Dotierung durchgeführt wurden, eine Hemmwirkung festzustellen. Eine Quantifizierung der Messdaten ist jedoch nicht möglich, da eine Verfälschung der Ergebnisse durch eventuelle Undichtigkeiten nicht ausgeschlossen werden kann.

#### 5.4.6 Hemmwirkung von Sulfamethazin (SMZ) und Trimethoprim (TMP)

Für die Bestimmung der Hemmwirkung von SMZ liegen nur drei Versuchswerte vor (Abbildung 5.11). Bis zu einer Konzentration von 150 mg/kg kann keine Hemmwirkung festgestellt werden. Erst ab 210 mg/kg kommt es zu einer 25-prozentigen Hemmung der Biogasproduktion. Der Schwellenwert liegt für SMZ in dem Bereich von 150 – 210 mg/kg.

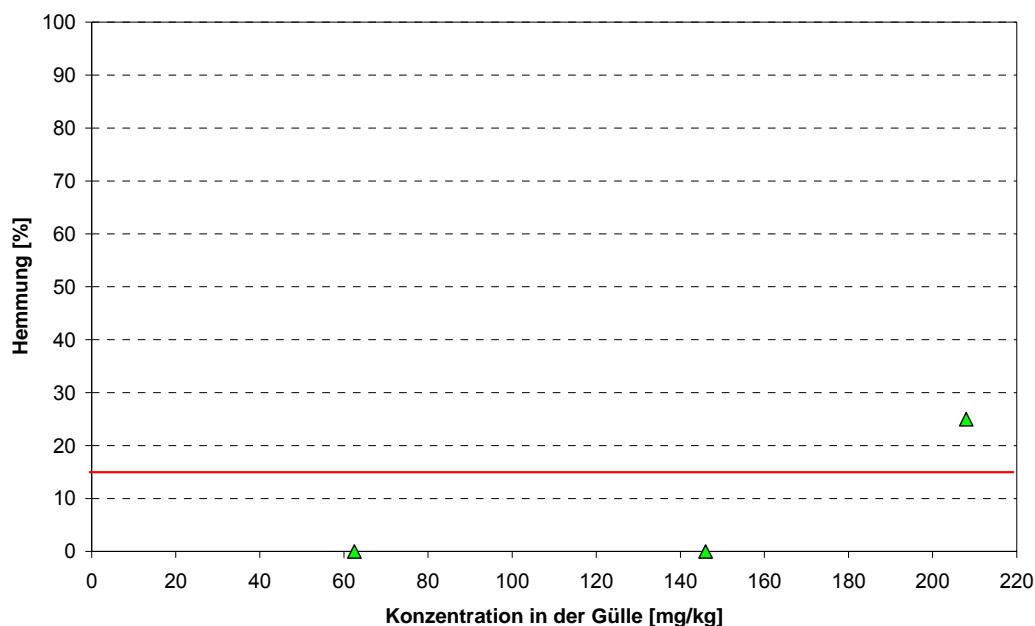


Abbildung 5.11: Hemmwirkung von verschiedenen SMZ-Konzentrationen (Gärtests mit Eudiometer)

#### 5.4.7 Hemmwirkung der Kombination SDZ + SMZ + TMP

Da SDZ und SMZ auch in Kombination verabreicht werden und somit auch gleichzeitig in der Gülle vorliegen können, wurde die Hemmwirkung von Gülle untersucht, die zu gleichen Teilen mit den beiden Sulfonamiden versetzt wurde. Die in Abbildung 5.12 angegebenen Konzentrationen zeigen immer die Gesamtkonzentration der beiden Sulfonamide an. Bei

400 mg/kg kommt es zu einer Hemmung der Gasproduktion von 13 %. Der Schwellenwert für die Kombination aus SDZ und SMZ liegt somit oberhalb von 400 mg/kg.

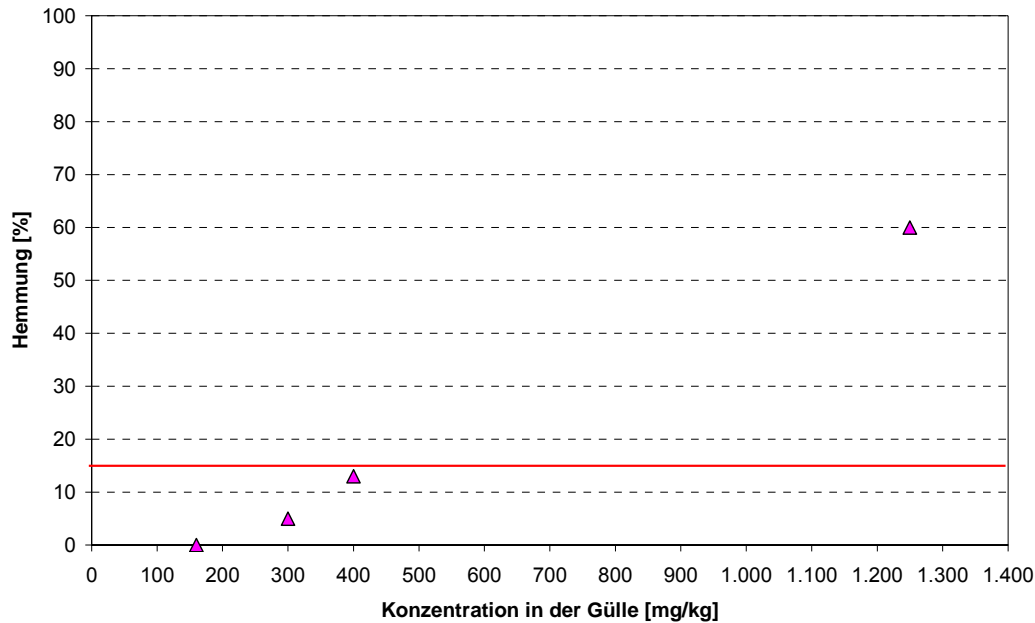


Abbildung 5.12: Hemmwirkung von verschiedenen SDZ+SMZ-Konzentrationen (Gärtests mit Eudiometer)

#### 5.4.8 Hemmwirkung von Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ )

Die Hemmwirkung von  $\text{CuSO}_4$  wurde in einem Konzentrationsbereich von 270 bis 4.800 mg/kg betrachtet (Abbildung 5.13). Werden die hohen Werte der Konzentrationen 300 und 600 mg/kg als Ausreißer betrachtet, kann ein linearer Verlauf der Dosis-Wirkungs-Beziehung festgestellt werden. Ab einer Konzentration von 1.250 mg/kg liegt die Hemmwirkung oberhalb von 29 %. Der Schwellenwert liegt für  $\text{CuSO}_4$  in dem Bereich von 600 - 1.250 mg/kg.

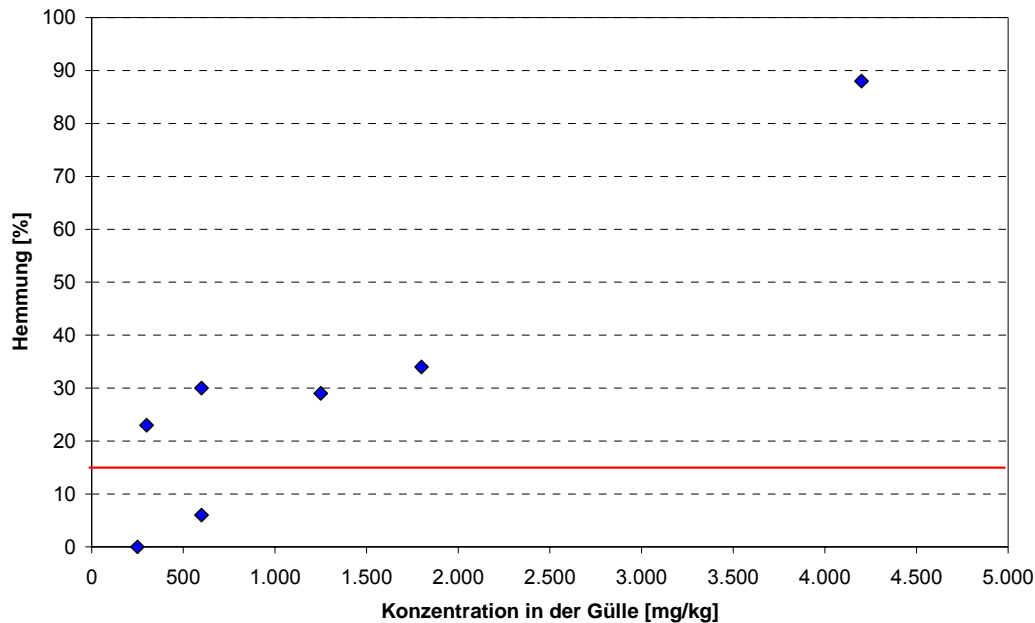


Abbildung 5.13: Hemmwirkung von verschiedenen  $\text{CuSO}_4$ -Konzentrationen (Gärtests mit Eudiometer)

#### 5.4.9 Hemmwirkung von quartären Ammoniumverbindungen

Auch die Hemmwirkung der quartären Ammoniumverbindungen (QAV) wurde mittels verschiedener Gärtests untersucht. Für die Dotierung der Versuchsansätze wurde ein Gemisch aus Benzylododecyldimethyl-ammoniumbromid (BAB-C12), Benzyltetradecyldimethyl-ammoniumchlorid (BAC-C14) und Benzylhexadecyldimethyl-ammoniumchlorid, (BAC-C16) verwendet. Die betrachteten Konzentrationen beziehen sich immer auf das Gemisch und lagen bei 75, 150 und 450 mg/kg. In Abbildung 5.14 sind die Ergebnisse dargestellt. Eine Hemmung von 14 % ist schon bei einer Konzentration von 75 mg/kg erkennbar. Eine 18-prozentige Hemmung liegt bei 150 mg/kg vor. Der Schwellenwert liegt für die hier untersuchten quartären Ammoniumverbindungen im Bereich von 75 - 150 mg/kg.

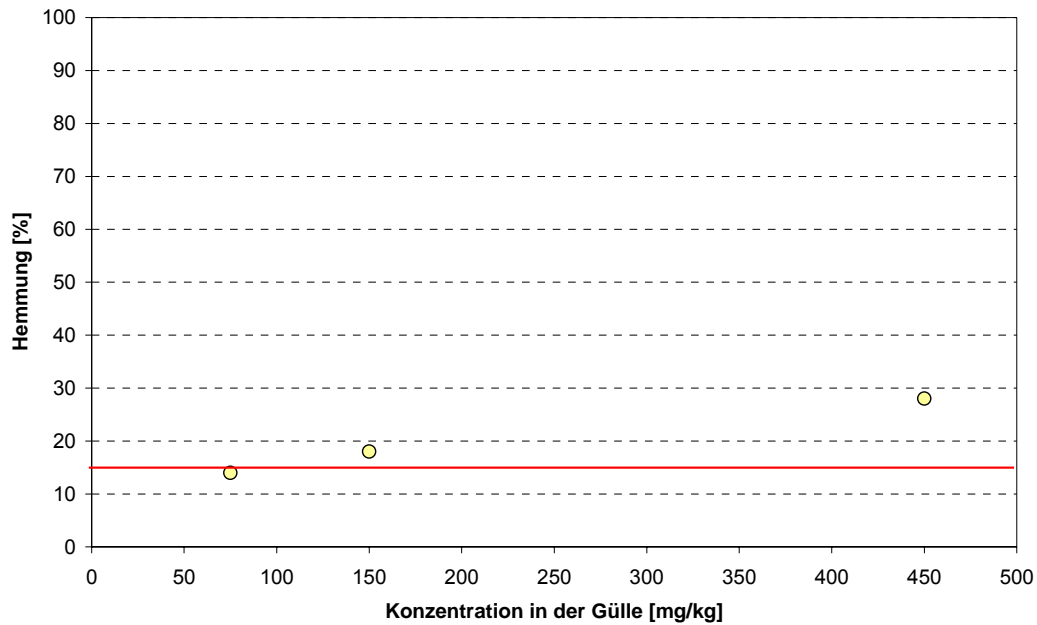


Abbildung 5.14: Hemmwirkung von verschiedenen Konzentrationen von quartären Ammoniumverbindungen (Gärtests mit Eudiometer)

#### 5.4.10 Hemmwirkung von Triclosan (TCL)

Für die Untersuchung der Hemmwirkung von Triclosan auf die gesamte Gasproduktion wurden verschiedene Konzentrationen betrachtet (10 - 100 mg/kg). Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.15 dargestellt. Bei einer Dotierung von 10 mg/kg kann keine Hemmung festgestellt werden, bei 100 mg/kg liegt die Hemmwirkung bei 36 - 42 %. Der Schwellenwert liegt für TCL im Bereich von 65 - 100 mg/kg.



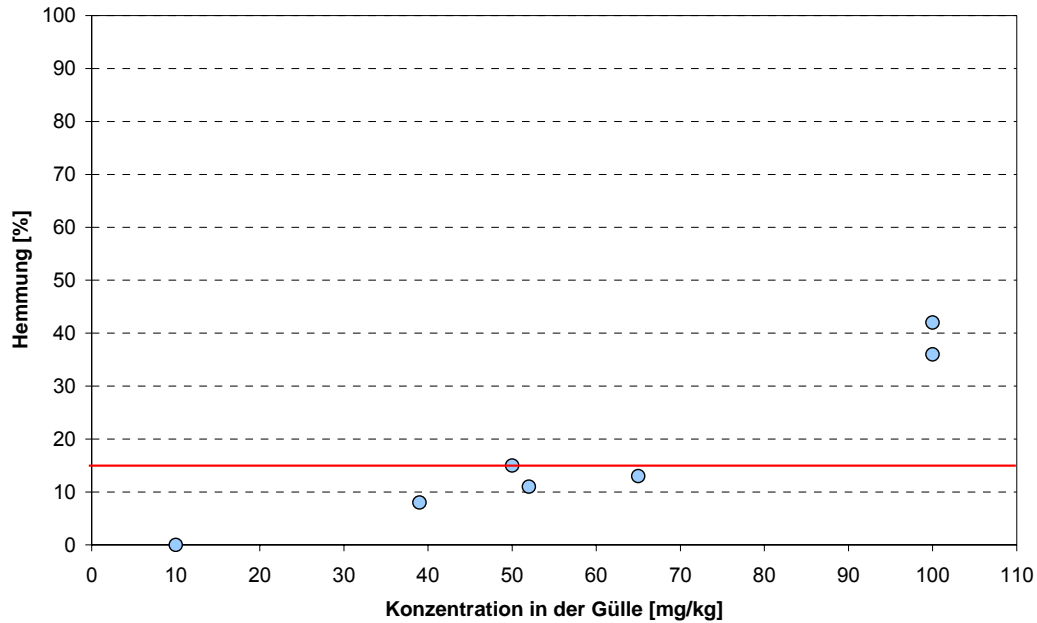


Abbildung 5.15: Hemmwirkung von verschiedenen TCL-Konzentrationen (Gärtests mit Eudiometer)

Abbildung 5.16 zeigt einen Gärtest im 5-L-Fermenter mit Triclosan als Hemmstoff, bei einer Konzentration von 100 mg/kg. Die Methankonzentrationen sowie die entstehenden Gasvolumina wurden zunächst sieben Tage ohne Dotierung aufgezeichnet. Da Triclosan in Ethanol gelöst zugegeben wurde, steigt die produzierte Gasmenge am siebten Tag nach Dosierung des Desinfektionsmittels in beiden Ansätzen zunächst stark an. Auch der Blindversuch wurde mit der gleichen Menge Ethanol versetzt wie der dotierte Ansatz. Nach 13 Tagen zeigt sich eine Hemmwirkung in der Gasproduktion. Der Methangehalt ist im dotierten Ansatz (80 % nach 28 Tagen) im Vergleich zum Blindversuch (75 % nach 28 Tagen) leicht erhöht.

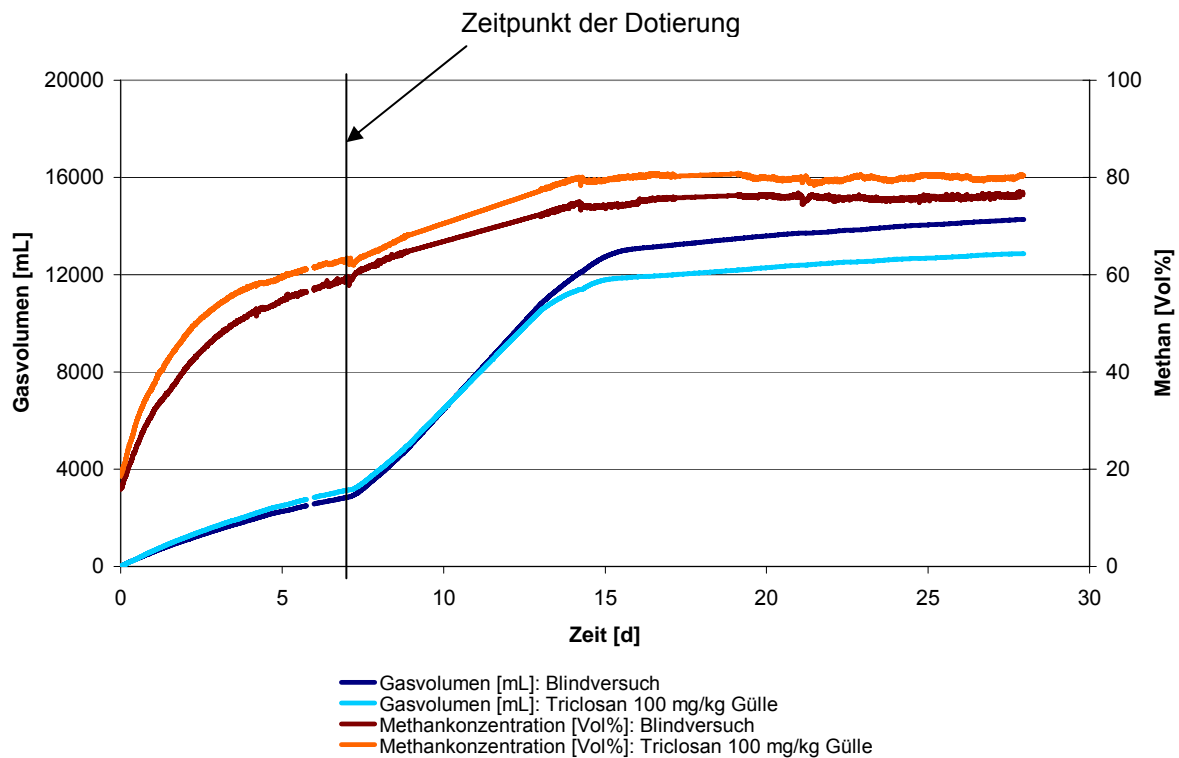


Abbildung 5.16: Hemmwirkung von Triclosan (100 mg/kg), Gasvolumen und Methankonzentration, 5-L-Fermenter

#### 5.4.11 Zusammenfassung – Hemmwirkung der verschiedenen Hemmstoffe

Für die bessere Vergleichbarkeit der verschiedenen Hemmstoffe sind in Tabelle 5.9 alle Konzentrationen und Hemmwirkungen aus den Gärtests mit Eudiometer zusammengefasst. Der Bereich der jeweiligen Schwellenwerte ist grau unterlegt. Die Schwellenwerte für CTC und TC liegen beide im Bereich von 125 - 250 mg/kg. Für OTC liegt der Schwellenwert im Bereich von 250 - 500 mg/kg. SDZ und SMZ unterscheiden sich deutlich in ihrer Hemmwirkung. Während SDZ erst in einem Bereich von 750 - 1.000 mg/kg hemmend wirkt, liegt der Schwellenwert für SMZ schon in einem Bereich von 150 - 210 mg/kg. Bei der Kombination der beiden Sulfonamide ist erst in einem Bereich von 400 - 1.250 mg/kg mit einer Hemmung zu rechnen. Da bei diesen Versuchen SDZ und SMZ zu gleichen Teilen eingesetzt wurden (jeweils 200 mg/kg), bedeutet dies für SMZ, dass die Hemmwirkung in Kombination mit SDZ abnimmt. Für die quartären Ammoniumverbindungen und TCL liegt der Schwellenwert in einer ähnlichen Größenordnung (75 - 150 bzw. 65 - 100 mg/kg).  $\text{CuSO}_4$  wirkt in einem Bereich von 600 - 1.250 mg/kg hemmend auf die Gasbildung.

Tabelle 5.9: Zusammenfassung der Hemmwirkung in den Gärtests

Wirkstoff	Konzentration [mg/kg Gülle]	Hemmung nach 28 Tagen [%]	TR Gülle [%]
Amoxicillin	62,5	3	9,0
	125	5	9,0
	250	0	9,0
CTC	125	10	7,0
	250	30	7,0
	375	45	7,0
	1250	87	6,5
TC	52	0	7,3
	62,5	20	15
	78	3	7,3
	125	11	15
	250	29	15
OTC	250	0	6,7
	500	39	3,9
	2500	73	3,9
SDZ (+ TMP)	208	0	8,3
	375	0	7,0
	750	5	11,3
	1000	20	2,5
SMZ (+ TMP)	62,5	0	7,3
	150	0	7,3
	210	25	8,3
SDZ +SMZ (+TMP)	80 + 80	0	5,4
	150 + 150	5	5,4
	200 + 200	13	5,4
	625 + 625	60	6,5
CuSO <sub>4</sub>	250	0	6,4
	300	23	1,5
	600	30	1,5
	600	6	6,1
	1250	29	6,4
	1.800	34	6,1
	4.200	88	6,1
QAV	75	14	8
	150	18	8
	450	28	4,9
TCL	10	0	4,8
	39	8	7,3
	50	15	4,8
	52	11	7,3
	65	13	7,3
	100	36	4,8
	100	42	5,4

## 5.5 Eliminations- / Abbauverhalten und Abbauprodukte

Im Rahmen der durchgeführten Gärtests zur Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen der einzelnen Substanzen und Substanzgruppen wurden auch analytische Kontrollen der untersuchten Substanzen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass einige Substanzen teilweise oder ganz, andere hingegen nicht abbaubar sind. Die Ergebnisse für die Tetracycline und die Sulfonamide sind in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben. Speziell für die Sulfonamide wurden zusätzlich Gärtests zur gezielten Überprüfung eines strukturabhängigen Abbaus durchgeführt. Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Feuchtmasse der eingesetzten Güllen.

### 5.5.1 Abbauverhalten Tetracycline

Um das Abbauverhalten der Tetracycline während der Fermentation zu untersuchen, wurden den Gärtests nach Versuchsende Proben entnommen und in der TiHo mit den zuvor erstellten Methoden analysiert (vgl. Kapitel 4.1.2). In Tabelle 5.10 sind die Messwerte des Gärtestes mit einer Dotierung von 1.250 mg CTC/kg aufgeführt.

Tabelle 5.10: Gemessene Konzentrationen CTC und Iso-CTC (Proben nach Versuchsende)

Probe	Dotierung [mg/kg]	TR Gülle [%]	gemessen [mg/kg]	
			CTC <sup>a</sup>	Iso-CTC <sup>b</sup>
1: CTC	1.250	6,5	139,9	829,0

<sup>a</sup> Summe aus CTC und epi-CTC

<sup>b</sup> Summe aus iso-CTC und epi-iso-CTC

Die zudotierte Substanzmenge konnte nicht vollständig wiedergefunden werden. Da bei diesem Versuch keine Proben vor Versuchsbeginn (nach Dotierung) genommen wurden, kann nicht abschließend beurteilt werden, ob ein (a)biotischer Abbau oder eine Elimination, z. B. durch Sorption stattgefunden hat.

In weiteren Gärtests mit den eingesetzten Konzentrationen 375, 250, und 125 mg CTC/kg wurden vor Versuchsbeginn und nach Versuchsende Proben entnommen. Aus den in Abbildung 5.17 dargestellten Ergebnissen ist zu erkennen, dass Iso-CTC das mengenmäßig wichtigste Abbauprodukt von CTC darstellt. Diese Umwandlung ist irreversibel und Iso-CTC zeigt eine deutlich niedrigere mikrobiologische Hemmwirkung als die Muttersubstanz CTC. {Schl, #0} Es besteht eine deutliche Korrelation zwischen der Menge an zudotierter Substanz und gemessener Konzentration CTC vor dem Versuch und Iso-CTC nach Versuchsende (Abbildung 5.18).

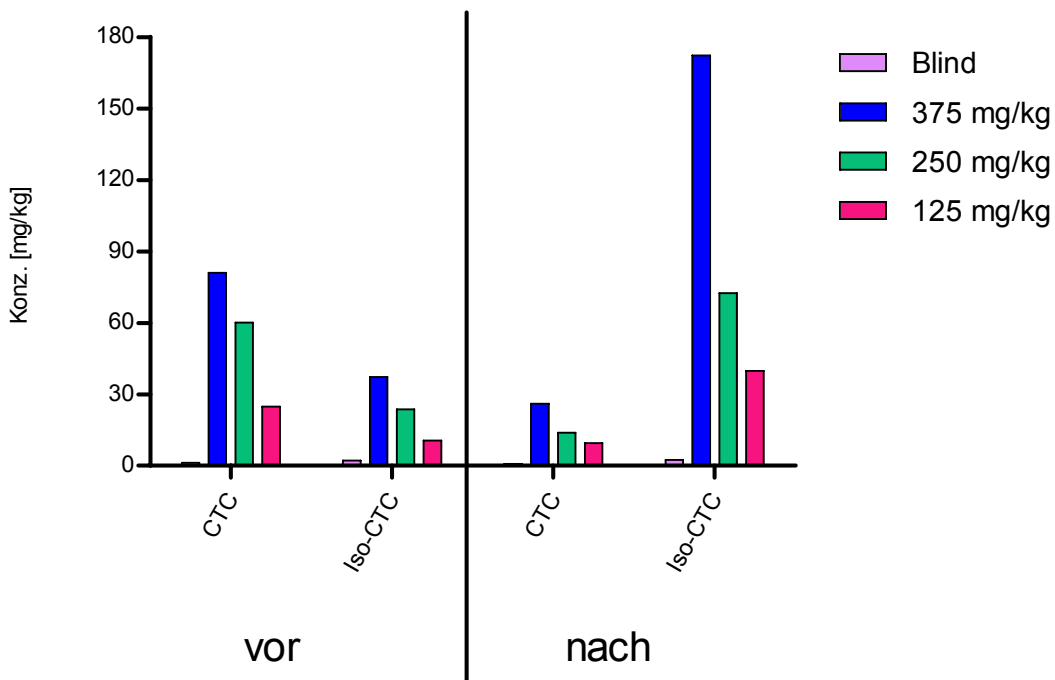


Abbildung 5.17: Gemessene Konzentrationen CTC und Iso-CTC vor und nach Versuchsende, Gärttest mit Eudiometer (TR Gülle: 8,3 %)

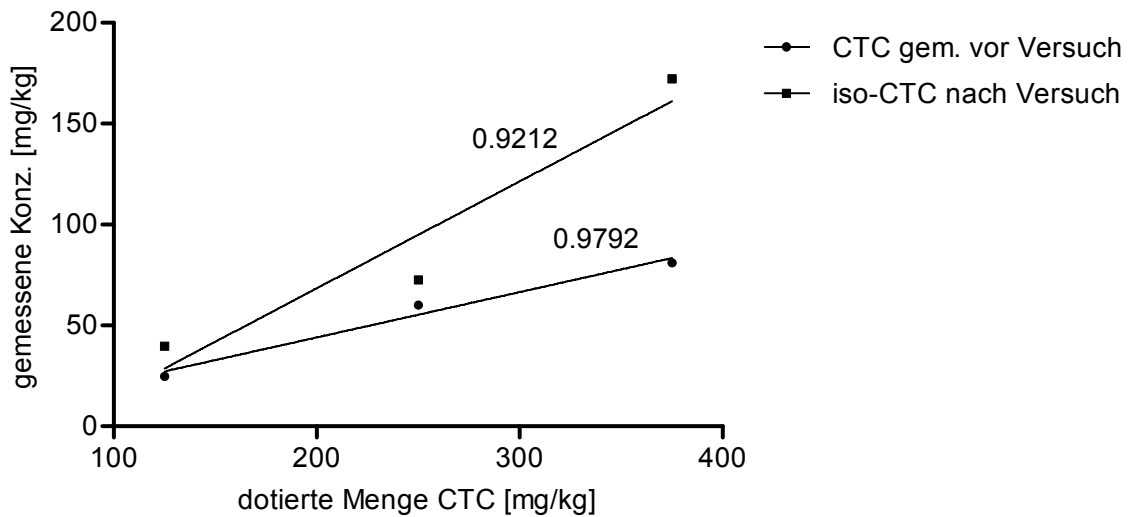


Abbildung 5.18: Korrelation Menge zudotierter Substanz und gemessene Konzentration

Auch bei der Wiederholung der Gärttests in den Konzentrationsbereichen für CTC zwischen 125 und 375 mg/kg (Tabelle 5.11) ist eine Korrelation zwischen zudotierter Substanzmenge CTC und ermittelter Konzentration Iso-CTC (nach Versuchsende) zu erkennen ( $R = 0,9790$ ). Wie in den vorherigen Gärttests ist die Gesamtmenge zudotierter Substanz aber nicht wiederzufinden.

Tabelle 5.11: Gemessene Konzentrationen CTC und Iso-CTC (Proben nach Versuchsende)

Probe	Dotierung [mg/kg]	TR Gülle [%]	gemessen [mg/kg]	
			CTC <sup>a</sup>	Iso-CTC <sup>b</sup>
Blind	-	8,3	0,1	0,3
2: CTC	375	8,3	24,5	137,5
3: CTC	250	8,3	16,0	82,5
4: CTC	125	8,3	13,0	65,5

<sup>a</sup> Summe aus CTC und epi-CTC

<sup>b</sup> Summe aus iso-CTC und epi-iso-CTC

Der Verbleib der kompletten Menge CTC konnte im Rahmen dieser Untersuchungen nicht geklärt werden. Selbst in Proben vor Versuchsbeginn (Abbildung 5.19) wird nicht die gesamte, zudotierte Menge an CTC gefunden. Auch ein Einbeziehen der Menge an schon identifiziertem Metaboliten (Iso-CTC) ergänzt die Bilanz nicht vollständig. Erklärungen hierfür können zum einen eine starke Sorption der Analyten an Güllebestandteile oder sonstige dem Fermenter zugesetzte Stoffe (auch schon direkt nach der Dotierung) sein, so dass diese nicht mehr extrahiert werden können. Zum anderen könnten auch noch nicht bekannte Metaboliten entstehen.

Tabelle 5.12 zeigt die Ergebnisse eines Gärtests in dem die Hemmwirkung von TC (eingesetzte Konzentrationen 250, 125 und 62,5 mg/kg) überprüft wurde. Auch hier kann nicht die komplette Menge an TC wiedergefunden werden. Im Gegensatz zu CTC konnte aber kein Metabolit identifiziert werden.

Tabelle 5.12: Gemessene Konzentrationen TC (Proben nach Versuchsende)

Probe	Dotierung [mg/kg]	TR Gülle [%]	gemessen [mg/kg]	
			TC <sup>a</sup>	CTC <sup>b</sup>
Blind vor	-	15	1,75	0,4
Blind	-	15	1,1	0,3
5: TC	250	15	69,8	0,7
6: TC	125	15	37,0	0,3
7: TC	62,5	15	18,5	0,3

<sup>a</sup> Summe aus Tetracyclin und seinem Epimer

<sup>b</sup> in undotierter Gülle enthalten

### 5.5.2 Abbauverhalten Sulfonamide und Trimethoprim

Auch die Sulfonamide wurden zunächst in einer hohen Konzentration auf ihr Abbauverhalten überprüft. In mehreren Gärtests wurden zum einen die Kombination von SDZ und TMP und zum anderen von SDZ, SMZ und TMP untersucht. In dem ersten Versuch wurde zunächst SDZ alleine (1.250 mg/kg) und in einem weiteren Versuch die Kombination von SDZ und SMZ (625 + 625 mg/kg) betrachtet. Die Ergebnisse der Analysen nach Versuchsende sind in Tabelle 5.13 dargestellt.

Tabelle 5.13: Gemessene Konzentrationen Sulfonamide nach Versuchsende, Gärtests mit Eudiometer

Probe	Dotierung [mg/kg]	TR Gülle [%]	gemessen [mg/kg]		
			SDZ	TMP	SMZ
1: SDZ +TMP	1250 + 250	6,5	541,5	< 0,15	< 0,15
2: SDZ + SMZ + TMP	625 + 625 + 250	6,5	263,3	< 0,15	229,0

In beiden Versuchsansätzen wird nur ca. die Hälfte der eingesetzten Sulfonamidmengen detektiert. Da hier keine Proben vor Versuchsbeginn entnommen wurden, kann nicht beurteilt werden, ob eine Elimination stattgefunden hat. Im folgenden Versuch wurden SDZ und SMZ jeweils mit einer Konzentration von 250 mg/kg betrachtet und Proben vor Versuchsbeginn sowie nach Versuchsende genommen. Dabei konnte eine vollständige Elimination von SDZ festgestellt werden (Abbildung 5.19). Die Konzentration an SMZ blieb hingegen fast unverändert. TMP konnte ebenfalls nur vor Versuchsbeginn detektiert werden. Alle Blindwerte waren unterhalb der Nachweisgrenze und wurden daher nicht dargestellt.

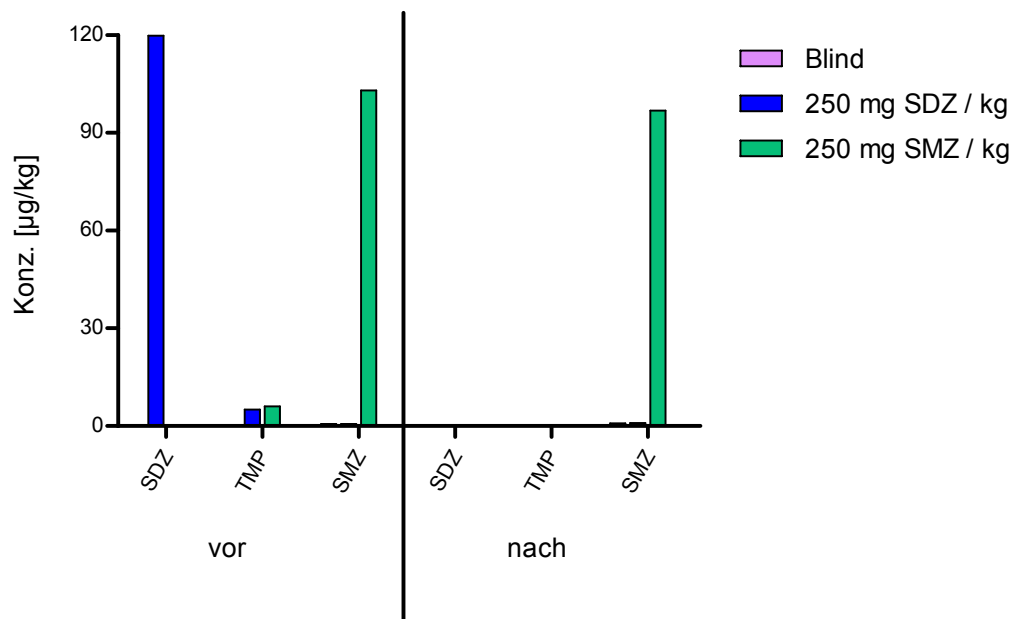


Abbildung 5.19: Gemessene Konzentrationen SDZ, SMZ und TMP vor und nach Versuchsende, Gärtests mit Eudiometer (TR Gülle: 8,3 %)

Anhand der nachfolgenden Ergebnisse (Tabelle 5.14 und Tabelle 5.15) wird deutlich, dass der mögliche Abbau von SDZ von der Art und Zusammensetzung der Gülle und des Fermenterinhalt der Biogasanlage, der zum Animpfen der Gärtests verwendet wurde, abhängig ist. Während Probe 3 und 4 (625 mg SDZ/kg bzw. 375 mg SDZ/kg) nur teilweise abgebaut werden, ist für Probe 6 (417 mg SDZ/kg) erneut eine komplette Elimination zu beobachten. SMZ wird auch, wenn es in Kombination mit SDZ dotiert wird, nicht abgebaut.

Tabelle 5.14: Gemessene Konzentrationen SDZ und SMZ nach Versuchsende, Gärtests mit Eudiometer

Probe	Dotierung [mg/kg]	TR Gülle [%]	gemessen [mg/kg]		
			SDZ	TMP	SMZ
3: SDZ + TMP	625 + 125	7,0	432,5	< 0,15	1,0
4: SDZ + TMP	375 + 75	7,0	364,5	< 0,15	0,8
5: SMZ + TMP	125 + 25	7,0	< 0,15	< 0,15	62,5



Tabelle 5.15: Gemessene Konzentrationen SDZ, SMZ und SDZ + SMZ nach Versuchsende, Gärtests mit Eudiometer

Probe	Dotierung [mg/kg]	TR Gülle [%]	gemessen [mg/kg]		
			SDZ	TMP	SMZ
Blind	-	n.b.	< 0,15	< 0,15	0,4
6: SDZ + TMP	417 + 83	n.b.	< 0,15	< 0,15	0,6
7: SMZ + TMP	417 + 83	n.b.	< 0,15	< 0,15	411,3
8: SDZ + SMZ + TMP	208 + 208 + 83	n.b.	< 0,15	< 0,15	186,6

n.b.: nicht bestimmt

Um den Konzentrationsverlauf der Sulfonamide während des Gärtests betrachten zu können, wurden am IUTA Versuche im 5-L-Maßstab durchgeführt und wöchentlich Proben entnommen und analysiert. Nachfolgend sind die Konzentrationsverläufe von Versuchen mit SDZ, SMZ, TMP und den Metaboliten Ac-SMZ und Ac-SDZ dargestellt. In Abbildung 5.20 ist das Abbauverhalten von SDZ und TMP bei Eingangskonzentrationen von 750 und 150 mg/kg dargestellt. Während TMP nur zu Beginn des Versuches nachgewiesen werden kann, ist SDZ während der Fermentation über vier Wochen in Höhe der Dotierung in allen wöchentlich entnommenen Proben nachweisbar. Es hat also kein Abbau von SDZ stattgefunden.

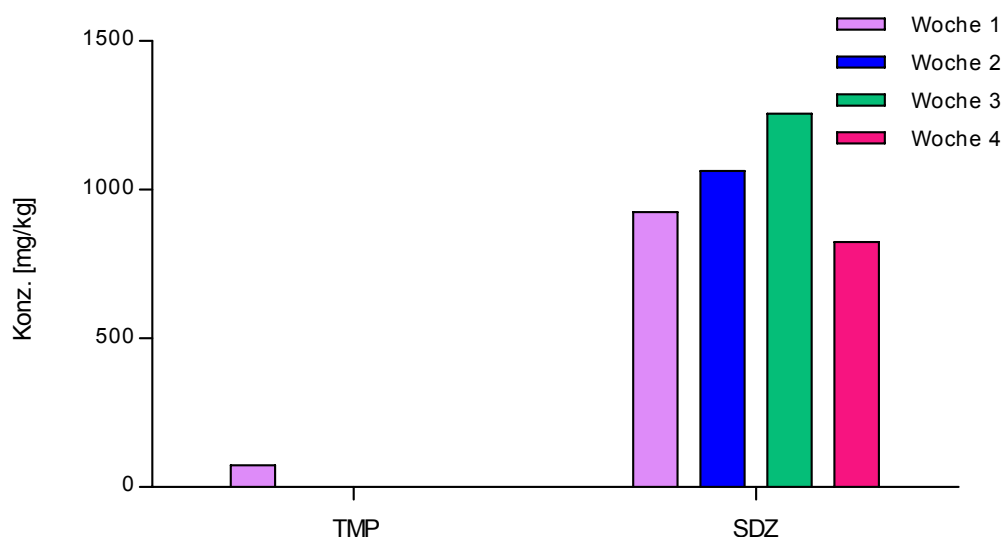


Abbildung 5.20: Konzentrationsverläufe von SDZ (750 mg/kg) und TMP (150 mg/kg), 5-L-Fermenter

SDZ wird auch mit einer Anfangskonzentration von 278 mg/kg, wie in Abbildung 5.21 dargestellt, während der Fermentation über sechs Wochen nicht abgebaut. TMP wurde in diesem Gärtest in der Konzentration von 56 mg/kg zugegeben. Die Ergebnisse der wöchentlichen

Probenahme zeigen hier einen Abbau von TMP bis zur vierten Woche, während SDZ und Ac-SDZ in konstanten Konzentrationsbereichen nachgewiesen werden können.

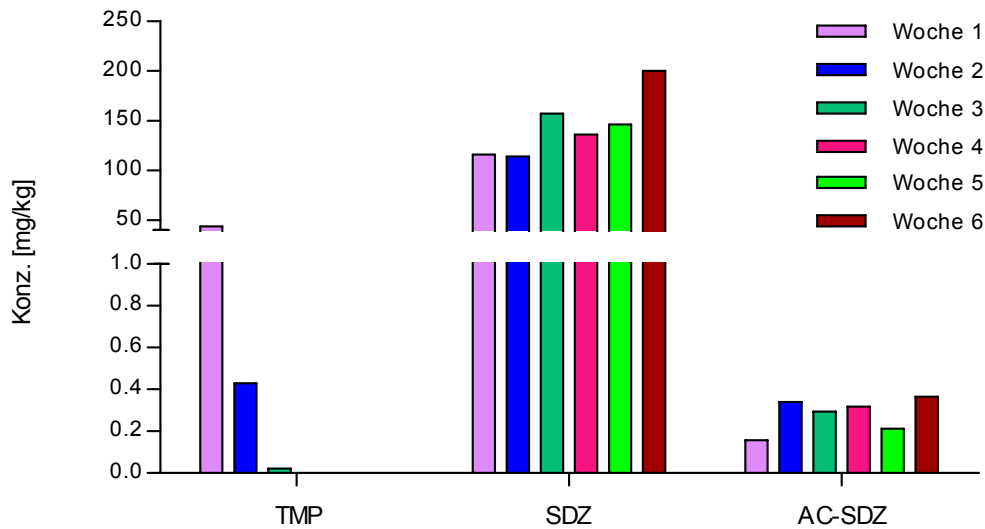


Abbildung 5.21: Konzentrationsverläufe von SDZ (278 mg/kg), Ac-SDZ und TMP (56 mg/kg), 5-L-Fermenter

Das Abbauverhalten von SDZ und SMZ in Kombination mit TMP sowie die Zunahme der acetylierten Sulfonamide sind in Abbildung 5.22 dargestellt. Die beiden Sulfonamide wurden in diesem 5-L-Gärtest in einer Konzentration von jeweils 500 mg/kg zugegeben. TMP wurde mit 100 mg/kg zudosiert. Aus der Analytik der wöchentlich entnommenen Proben kann festgestellt werden, dass TMP nur bis zur dritten Woche nachgewiesen werden kann. Die Sulfonamide SDZ und SMZ sind hingegen über die Fermentation von sechs Wochen im Konzentrationsbereich der vorgenommenen Dotierung nachweisbar. Weiterhin ist eine Zunahme der acetylierten Sulfonamide über die Dauer der Fermentation zu verzeichnen.

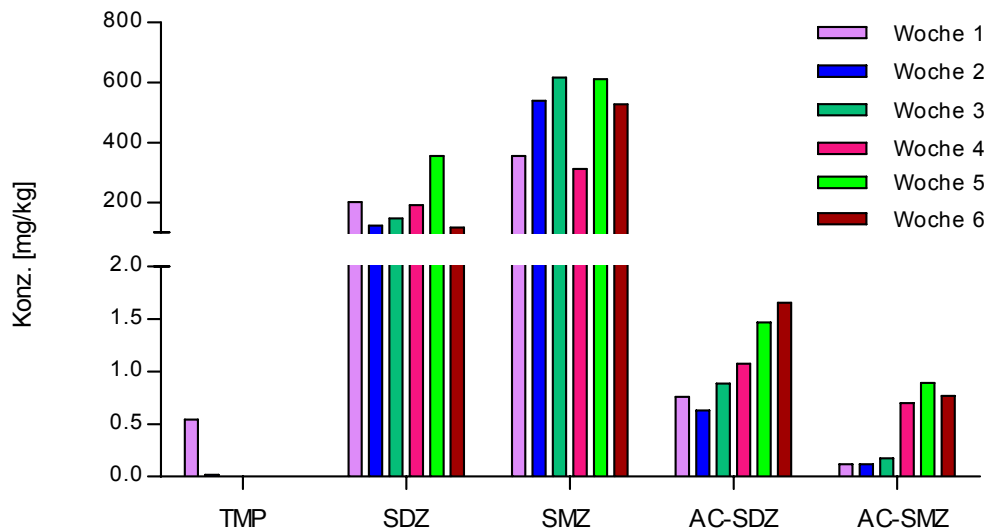


Abbildung 5.22: Konzentrationsverläufe von SDZ (500 mg/kg), Ac-SDZ, SMZ (500 mg/kg), Ac-SMZ und TMP (100 mg/kg), 5-L-Fermenter

Die Versuche am IUTA zum Abbauverhalten der Sulfonamide im Gärtest bestätigen die Gärversuche, die am Anfang der Studie bei UMSICHT durchgeführt wurden. Bei hohen Konzentrationen der Sulfonamide findet kein Abbau von SDZ statt. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die hohen Konzentrationen die Wirkung der abbauend wirkenden Bakterien zu stark hemmen. In geringeren Konzentrationen findet ein Abbau von einigen Sulfonamiden statt. Jedoch ist die Grenze nicht sehr scharf, da offensichtlich auch die Art und Zusammensetzung der verwendeten Gülle und des Fermenterinhaltendes der Biogasanlage, der zum Animpfen der Gärtests verwendet wurde, für die Abbaubarkeit eine Rolle spielt.

Um den Abbau der verschiedenen Sulfonamide genauer zu untersuchen, wurde im Rahmen eines weiteren Gärtests im 5-L-Fermenter die Gülle mit den sieben Sulfonamiden Sulfadiazin (SDZ), Sulfathiazol (STZ), Sulfamerazin (SMR), Sulfamethazin (SMZ), Sulfamethoxypyridazin (SMPD), Sulfamethoxazol (SMX) und Sulfadimethoxin (SDM) jeweils in einer Konzentration von 2 mg/kg dotiert. TMP wurde im Verhältnis 1:5 zur Gesamtkonzentration der Sulfonamide hinzugegeben. Die verschiedenen gemessenen Konzentrationen sind in Abbildung 5.23 dargestellt.

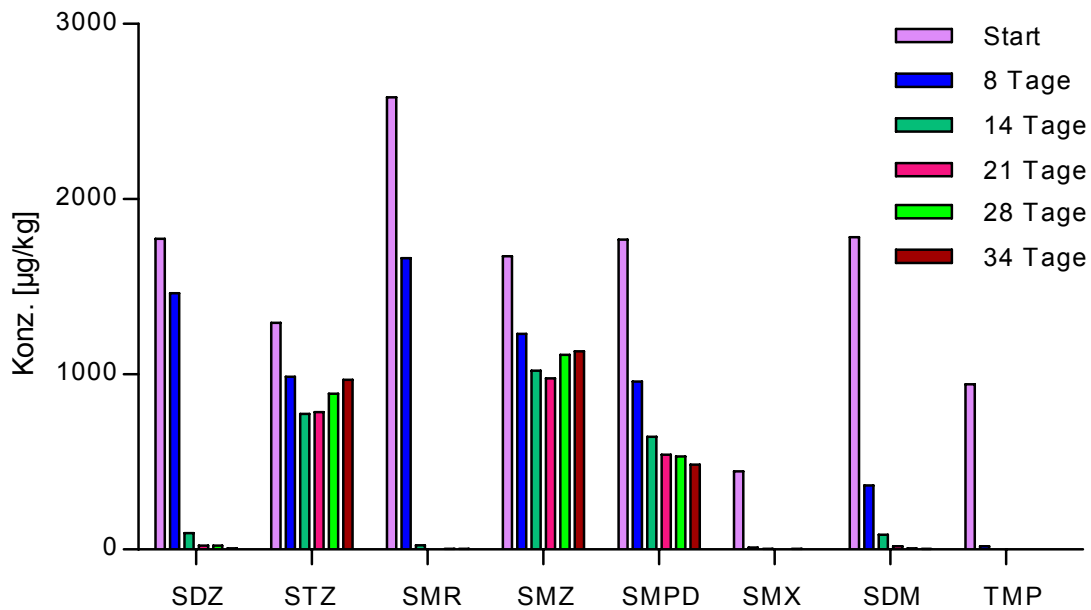


Abbildung 5.23: Konzentrationsverläufe von sieben Sulfonamiden (jew. 2 mg/kg), 5-L-Fermenter

Vier der sieben Sulfonamide wurden innerhalb von vier Wochen abgebaut. Jedoch ist die Abbaurate unterschiedlich. Während TMP und SMX direkt nach einer Woche abgebaut werden, sind SDZ und SMR erst nach zwei Wochen zu 95 % abgebaut. Analog dazu wurde ein zweiter Gärttest mit 10 mg Sulfonamid pro kg Gülle angesetzt, der die hier beschriebenen Ergebnisse bestätigte.

### 5.5.3 Identifizierung von Metaboliten

Für SDZ konnte im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen ein Metabolit chromatographisch getrennt, identifiziert und halbquantitativ bestimmt werden. Der Metabolit weist eine nominale Masse von 267 g/mol auf. Diese ist damit um 16 g/mol höher als die der Muttersubstanz, was auf den Einbau eines Sauerstoffatoms z. B. im Rahmen einer Hydroxylierung hindeutet. Mittels HPLC wurde der Metabolit angereichert und über UV-Spektrometrie bestimmt. Es konnten ca. 22 µg isoliert werden. In verschiedenen Untersuchungen wurde der Metabolit näher identifiziert.

Zunächst wurde ein Brillantschwarzreduktionstest zur Überprüfung der mikrobiologischen Hemmwirkung des Metaboliten durchgeführt (BRT MRL-Suchtest, AiM München). Dieser Test wird zum Hemmstoffnachweis in Milchproben eingesetzt. Dazu wurde der Metabolit in wässriger Lösung aufgenommen und eine Konzentrationsreihe in Milch angesetzt. Zum Vergleich wurde ebenfalls eine Konzentrationsreihe der Muttersubstanz SDZ in Milch angesetzt und beide im Hemmstofftest parallel überprüft. Sowohl die photometrische als auch die visuelle Auswertung (vgl. Abbildung 5.24) zeigten eine mikrobiologische Hemmwirkung des

Metaboliten unterhalb von 10 %, was eine sehr gute Übereinstimmung mit bereits publizierten Werten für Hydroxy-Sulfadiazin bedeutet. {Schl, #0}

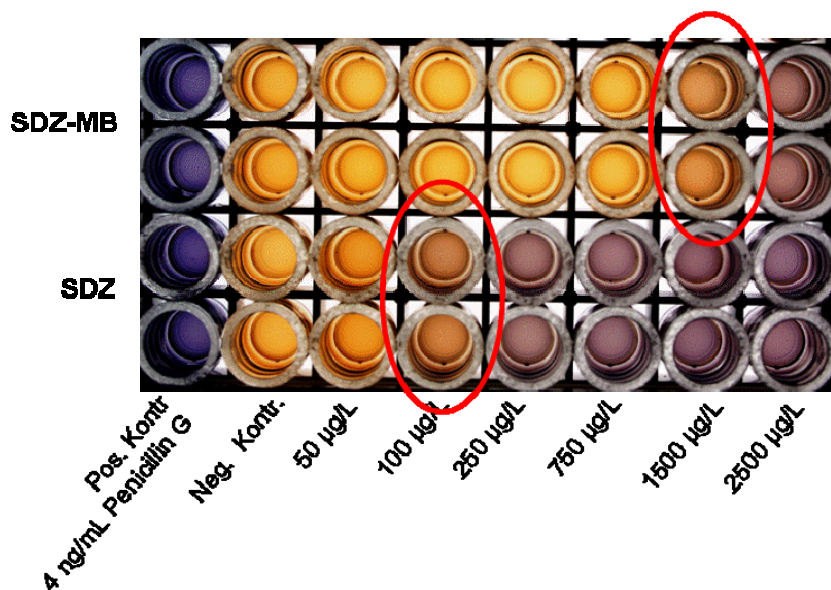


Abbildung 5.24: Foto BRT (Hemmwirkung des Metaboliten)

Weitere Identifizierungsversuche wurden mit Hilfe eines LECO Unique Time of Flight Massenspektrometers durchgeführt. Mittels ESI-ToF-MS konnte für den protonierten Metaboliten eine exakte Masse von 267,0545 g/mol bestimmt werden. Von der erwarteten Masse beträgt die Abweichung -0,42 ppm, so dass für den isolierten Metaboliten die Summenformel  $C_{10}H_{10}N_4O_3S$  eindeutig nachgewiesen ist.

Nach Lamshöft et al. deutet ein vorhandenes  $m/z$  112-Fragment (Abbildung 5.25) nach Fragmentierung der molaren Masse von 267 g/mol auf einen Hydroxy-Metaboliten hin {Engels, 2004 #172; Winckler, 2004 #190}. Dieses Fragment konnte eindeutig nachgewiesen werden und der gefundene Metabolit als Hydroxy-SDZ identifiziert werden. Bislang wurden zwei Hydroxylierungen am Pyrimidinring in der Literatur beschrieben: 4-OH und 5-OH-SDZ. Eine Unterscheidung dieser beiden Substanzen ist nunmehr durch den Einsatz der  $MS^3$ -Technik möglich {Eberhard, 2008 #170}. Hierbei wird das  $m/z$  112-Fragment des  $MS^2$ -Experiments in der Ionenfalle gefangen und erneut fragmentiert. Das nachgewiesene  $m/z$  70-Fragment (Abbildung 5.26) wird nur von 4-OH-SDZ gebildet. Dies lässt den Schluss zu, dass durch den Fermentationsprozess selektiv 4-OH-SDZ aus SDZ gebildet wurde.

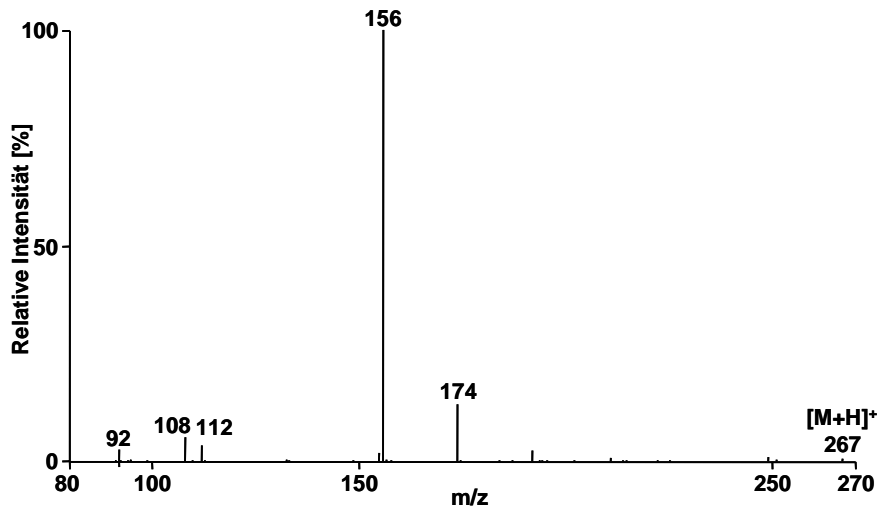


Abbildung 5.25: MS-MS Spektrum SDZ-Metabolit (TiHo)

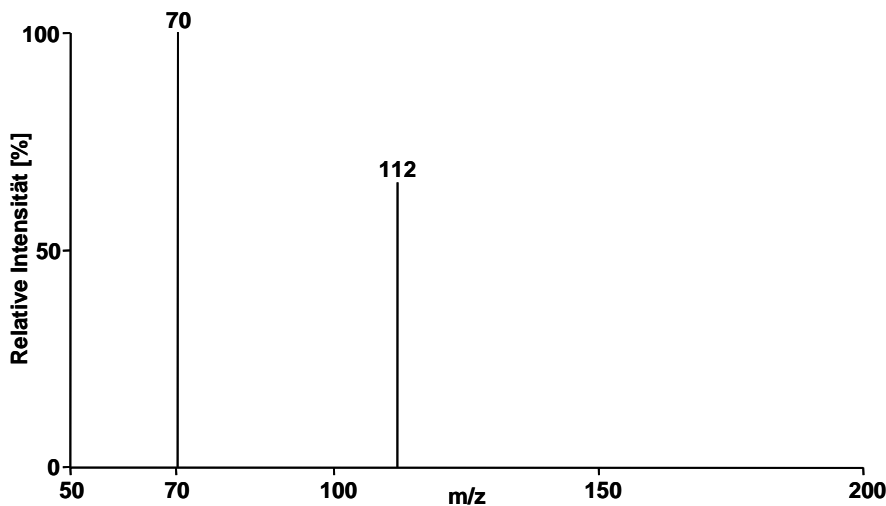


Abbildung 5.26: MS<sup>3</sup>-Spektrum SDZ-Metabolit, Fragmentierung des m/z 112-Fragments (TiHo)

## 5.6 Auswahl des anaeroben Testorganismus

Für den Einsatz im Hemmstofftest kommen thermophile anaerobe Testkeime, die die Fähigkeit zur Sporenbildung besitzen, in Frage. Durch die hohe Temperatur und das sauerstofffreie Milieu werden selektive Bedingungen geschaffen, die die Kontamination mit Fremdkeimen verhindern sollen. In Zusammenarbeit mit dem projektbegleitenden Ausschuss wurden folgende in Frage kommende thermophile anaerobe Bakterien ausgewählt:

- *Clostridium thermobutyricum* (*C. thermobutyricum*)
- *Clostridium thermaceticum* (*C. thermaceticum*)
- *Geobacillus stearothermophilus*

Bakterien der Gattung *Clostridium* sind bei der anaeroben Gärung in Biogasanlagen maßgeblich beteiligt, daher wurden zunächst *C. thermaceticum* und *C. thermobutyricum* getestet. Da sich das Wachstum von *C. thermaceticum* als zu langsam herausstellte und mit *C. thermobutyricum* die Versuche auf Anhieb erfolgreich waren, wurde *C. thermobutyricum* als Testkeim ausgewählt. Zur Ausarbeitung der Methodik für den Agardiffusionstest wurden wegen der leichteren Handhabung zunächst Vorversuche mit dem aeroben Bakterium *Bacillus subtilis* durchgeführt.

## **5.7 Untersuchung der Hemmwirkung mittels Agardiffusionstests**

Als Vorversuche für die Entwicklung des Hemmstofftests wurden Agardiffusionstests durchgeführt, die zunächst unter Einwirkung von Luftsauerstoff (aerob) mit *Bacillus subtilis* und später unter Luftabschluss (anaerob) mit dem späteren Testorganismus *Clostridium thermobutyricum* durchgeführt wurden. Hierfür musste zunächst das optimale Medium für die Anzucht und für die Versuche ermittelt werden.

### **5.7.1 Aerobe Agardiffusionstests mit *Bacillus subtilis***

Für die Untersuchung der Hemmwirkung mittels aerober Agardiffusionstests mit *Bacillus subtilis* wurden die entsprechenden Hemmstoffe eingewogen und in destilliertem Wasser bzw. in Gülle gelöst. Von beiden Ansätzen wurden Verdünnungsreihen mit folgenden Konzentrationen angefertigt: 250 mg/L, 125 mg/L, 62,5 mg/L, 31,25 mg/L, 15,63 mg/L und 7,81 mg/L (Konzentrationen für die Gülleansätze: mg/kg).

Um die Testblättchen mit dem Hemmstoff zu beschicken, wurden sie in die jeweilige Testlösung mit der gewünschten Konzentration eingetaucht bis sie sich vollgesogen hatten (ca. 30 bis 60 Sekunden). Diese Testblättchen wurden mittig auf eine Bakterien-Nähragar-Platte gelegt und leicht angedrückt. Die Platten wurden über Nacht bei 30 °C bebrütet. Für die Auswertung wurden die entstandenen Hemmhöfe ausgemessen und ausgewertet. Die Versuche wurden mit SDZ, Amoxicillin und Penicillin G durchgeführt. In Abbildung 5.27 ist ein Foto des gebildeten Hemmhofes für das in Gülle gelöste Antibiotikum SDZ (unter Zugabe von TMP) mit einer Konzentration von 250 mg/kg dargestellt.



Abbildung 5.27: Foto der Hemmhofausbildung für *Bacillus subtilis*

Wie in Abbildung 5.28 zu sehen ist, nimmt für SDZ + TMP mit zunehmender Antibiotika-Konzentration auch der Hemmhofdurchmesser zu. Auch bei Amoxicillin (Abbildung 5.29) wird der Hemmhofdurchmesser mit steigender Konzentration größer. Zudem sind hier im Gegensatz zu SDZ + TMP die Hemmhofdurchmesser der Wasseransätze durchweg höher als die der Gülleansätze.

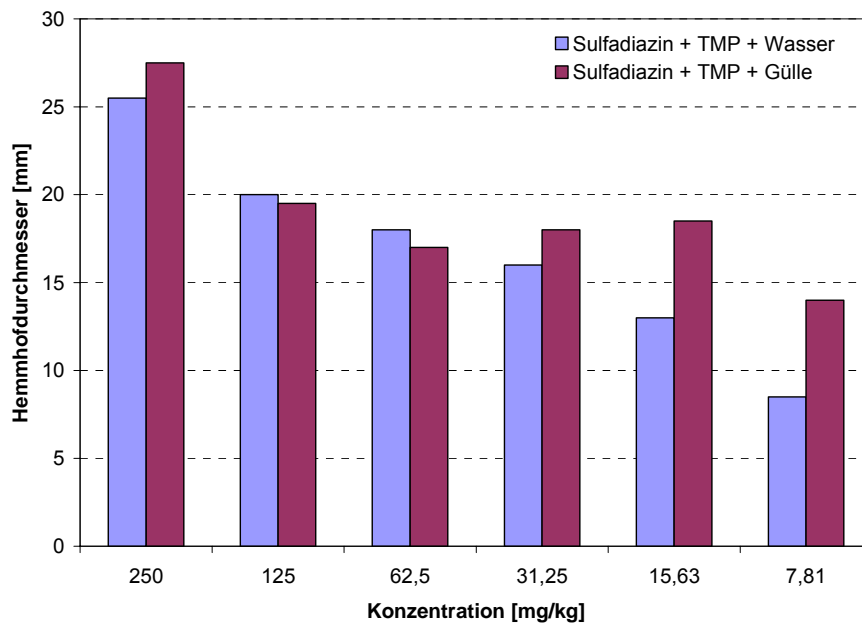


Abbildung 5.28: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmwirkung von SDZ und TMP (pH 7,2) mit *Bacillus subtilis*



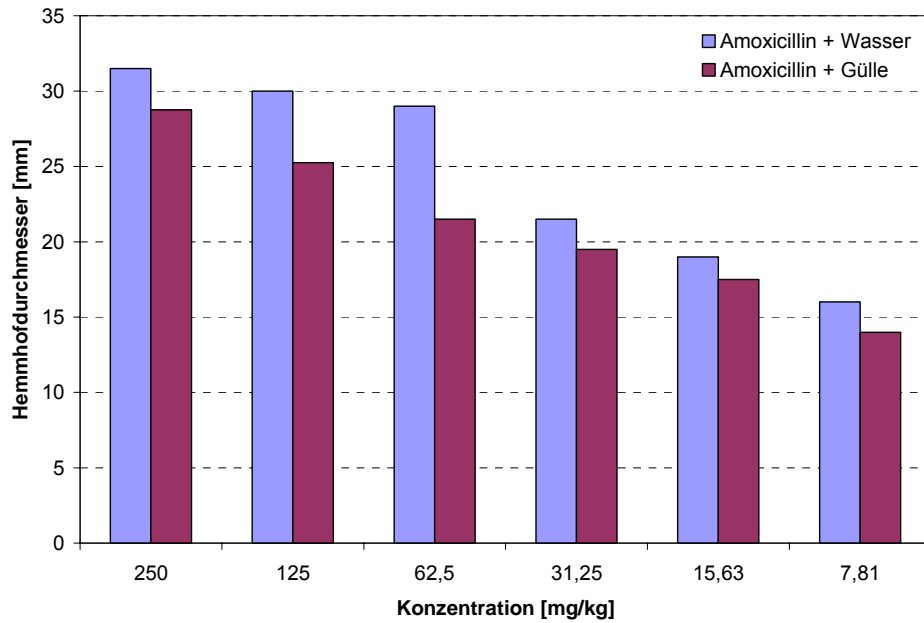


Abbildung 5.29: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmwirkung von Amoxicillin (pH 5) mit *Bacillus subtilis*

Bei dem Vergleich von Amoxicillin und Penicillin G in Abbildung 5.30 wird die pH-Wert-Abhängigkeit der Hemmwirkung deutlich. Bei beiden Antibiotika ist die Hemmwirkung bei pH 6 und pH 7 schwächer als bei pH 5 und pH 8.

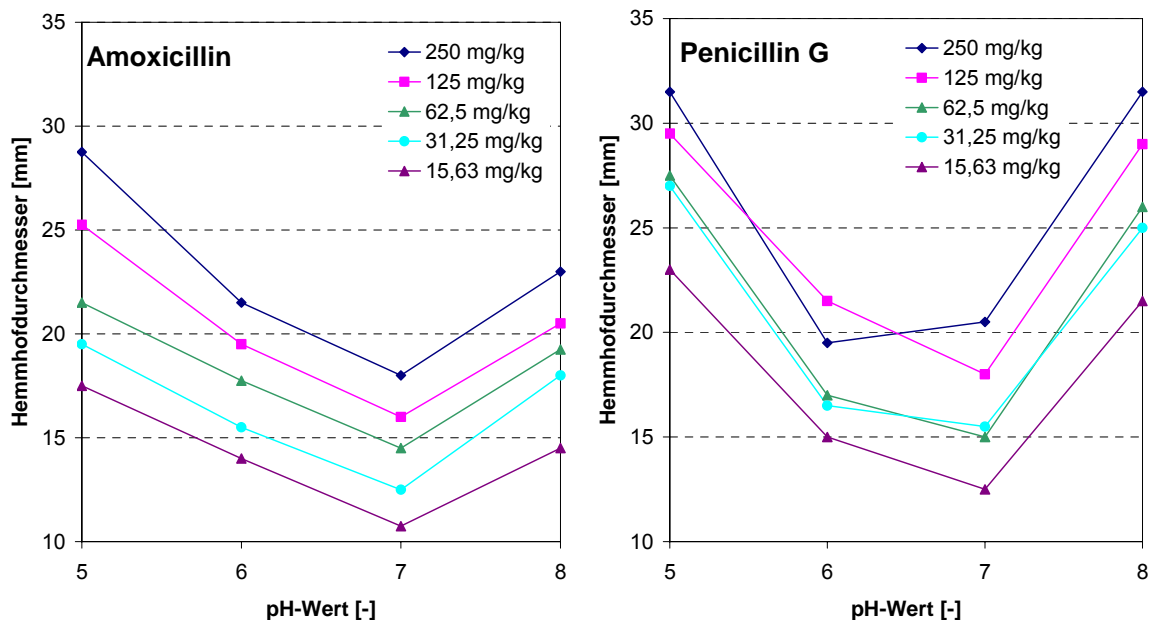


Abbildung 5.30: pH-Wert-Abhängigkeit der Hemmwirkung von Amoxicillin (links) und Penicillin G (rechts) bei verschiedenen Konzentrationen mit *Bacillus subtilis*

### 5.7.2 Anaerobe Agardiffusionstests mit *Clostridium thermobutyricum*

Nach den Vorversuchen mit dem aeroben Bakterium *Bacillus subtilis* wurde das für den Einsatz im Testsystem ausgesuchte anaerobe Bakterium *Clostridium thermobutyricum* für die Versuche im Agardiffusionstest verwendet. Zur Anzucht kam das Fertigmedium RCM (Reinforced Clostridia Medium, Oxoid, Wesel) zum Einsatz. Das Medium wurde sowohl zur Anzucht im Schüttelkolben als auch unter Zugabe von Agar als Medium für die Hemmhoftests verwendet.

Die Herstellung der Bakterien-Nähragar-Platten und die Versuchsdurchführung erfolgten analog zu den Versuchen mit *Bacillus subtilis*. Die Bebrütung der Platten fand aber bei 55 °C unter Luftabschluss in der Anaerobenwerkbank statt. Für die Auswertung wurden die entstandenen Hemmhöfe (Abbildung 5.31) ausgemessen und ausgewertet.

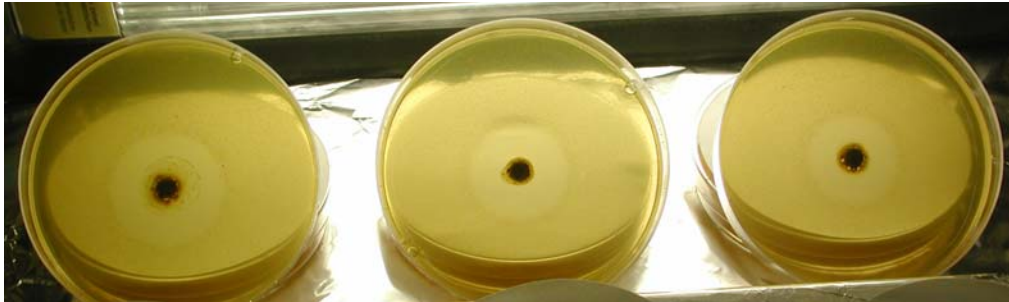


Abbildung 5.31: Foto der Hemmhofausbildung für *Clostridium thermobutyricum*

In Abbildung 5.32 sind die Hemmhofdurchmesser in Abhängigkeit von der Konzentration für die beiden Antibiotika CTC und SDZ dargestellt. Im Vergleich der beiden Antibiotika bei der Konzentration von 50 mg/kg zeigt sich eine deutlich höhere Hemmwirkung von CTC (Hemmhofdurchmesser 27 mm) im Gegensatz zu SDZ (Hemmhofdurchmesser 15 mm). Mit zunehmender Konzentration steigt die Hemmwirkung von SDZ an und liegt bei einer Konzentration von etwa 225 mg/kg im gleichen Bereich wie die von CTC.

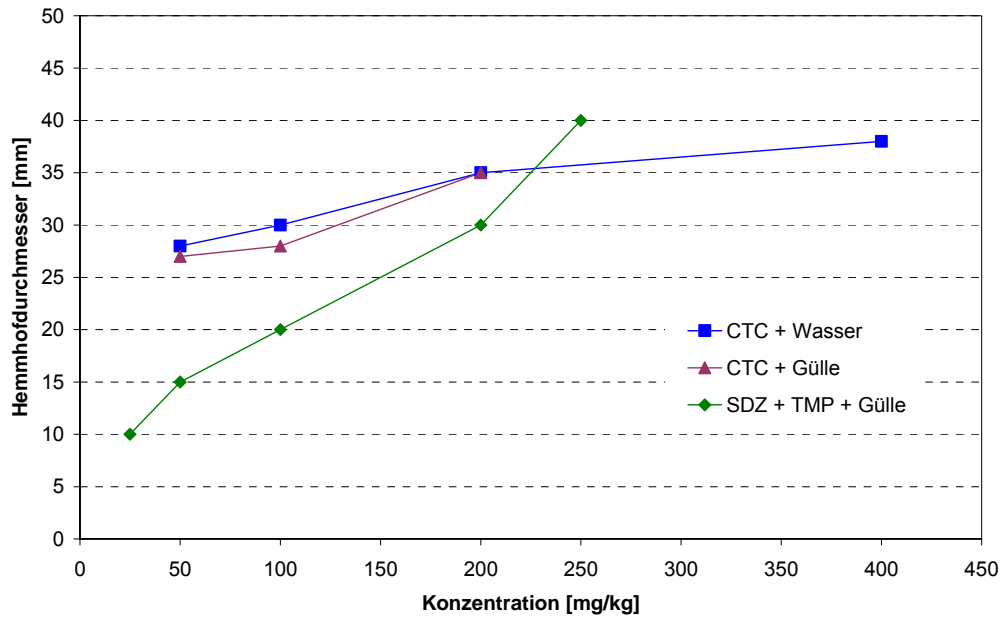


Abbildung 5.32: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmwirkung von CTC und SDZ mit *Clostridium thermobutyricum*

## 5.8 Konstruktion und Erprobung des Hemmstofftests

Nach den Versuchen zur Dosis-Wirkungs-Beziehung und zur Ermittlung der Hemmhöhe auf Agarplatten ist der in Abbildung 5.33 dargestellte Testaufbau denkbar. Das geeignete Medium wird mit den Sporen von *Clostridium thermobutyricum* (*C. thermobutyricum*) und einem Farbindikator (Bromkresolpurpur mit einem Farbumschlag bei pH 6,8 - 5,2) vermischt und in Teströhrchen abgefüllt. Zur Durchführung des Testes wird die Gülleprobe auf die Oberfläche des Mediums aufgetragen und nach ca. 30 Minuten, in denen die möglichen Hemmstoffe in das Medium diffundieren können, abgeschüttet. Sofort danach wird mit Paraffinöl überschichtet, um das anaerobe Milieu aufrecht zu erhalten. Nach einer Inkubation bei 55 °C kann anhand der Farbreaktion die Hemmwirkung der Gülle abgelesen werden. Zur eindeutigen Beurteilung und Interpretation der Farbreaktion muss eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

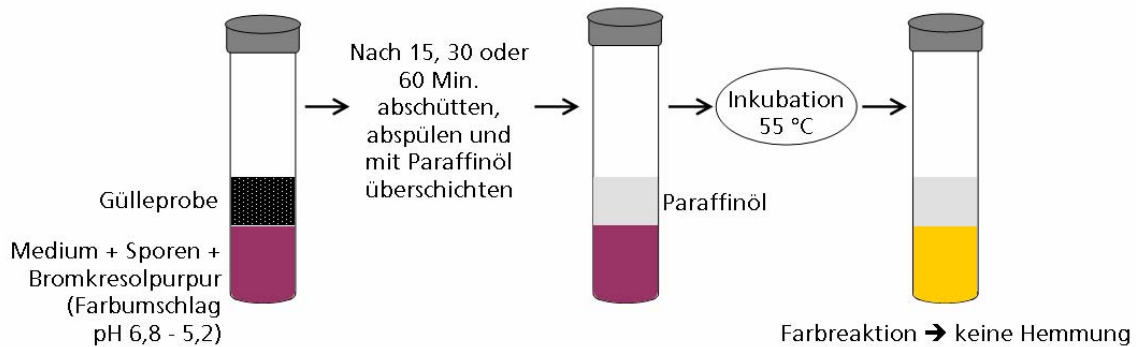


Abbildung 5.33: Möglicher Aufbau des Hemmstofftests

### 5.8.1 Herstellung der Teströhrchen

Zur Herstellung der Teströhrchen wurde der in Kapitel 4.3.2 beschriebene RC-Agar mit geringen Modifikationen als Nähragar verwendet. Dem Nähragar wurde der Indikator Bromkresolpurpur (Farbumschlag von gelb nach violett), dessen Umschlagspunkt sich im Bereich von pH 5,2 - 6,8 befindet, in der Konzentration 0,04 g/L zugesetzt. Im Weiteren wurde die verwendete Agarmenge von 15 g/L auf 30 g/L erhöht. Nach dem Autoklavieren des Agars und nach der Zugabe der separat autoklavierten Glucose- und Stärkestammlösung wurde der RC-Agar für mindestens 30 Minuten steril mit Stickstoff bei einer Temperatur von ca. 80 °C begast. Die Sporensuspension von *C. thermobutyricum* wurde durch Zentrifugation aufkonzentriert und mit dem entgasten RC-Agar vermischt. Diese Mischung wurde in 2 mL Portionen in die sterilen Teströhrchen verteilt. Die erstellten Teströhrchen wurden zum Aushärten bei 5 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Abbildung 5.34 zeigt ein nicht inkubiertes Teströhrchen bei Raumtemperatur.



Abbildung 5.34: Nicht inkubiertes Teströhrchen bei RT

Beim Wachstum der Bakterien werden organische Säuren gebildet, die den pH-Wert im Teströhrchen verringern. Der durch das Bakterienwachstum induzierte Farbumschlag von

violett nach gelb beginnt nach 4,5 Stunden, ist nach 7,5 Stunden vollständig abgeschlossen und weist eine komplette wie in Abbildung 5.35 zu erkennende gelbe Färbung auf.



Abbildung 5.35: Teströhrchen nach einer Inkubationszeit von 7,5 h

### 5.8.2 Durchführung der Hemmstofftests mit den Teströhrchen

Bei den ersten Versuchen mit wässrigen Antibiotikallösungen wurden sowohl die Einflüsse der Agarmenge im Teströhrchen (1 mL, 2 mL oder 3 mL RC-Agar), als auch die Einwirkzeit (15, 30 oder 60 Minuten) der Antibiotikallösung untersucht. Nach der jeweiligen Einwirkzeit wurde die Antibiotikallösung abgeschüttet und die Agaroberfläche zum Schutz gegen Luft-sauerstoff mit 1 bis 2 mL Paraffinöl überschichtet. Anschließend wurden die Teströhrchen bei 55 °C solange bebrütet, bis die Blindwerte eine Gelbfärbung aufwiesen. Beispielhaft ist in Abbildung 5.36 ein Hemmtest nach der Versuchsdurchführung zu sehen.

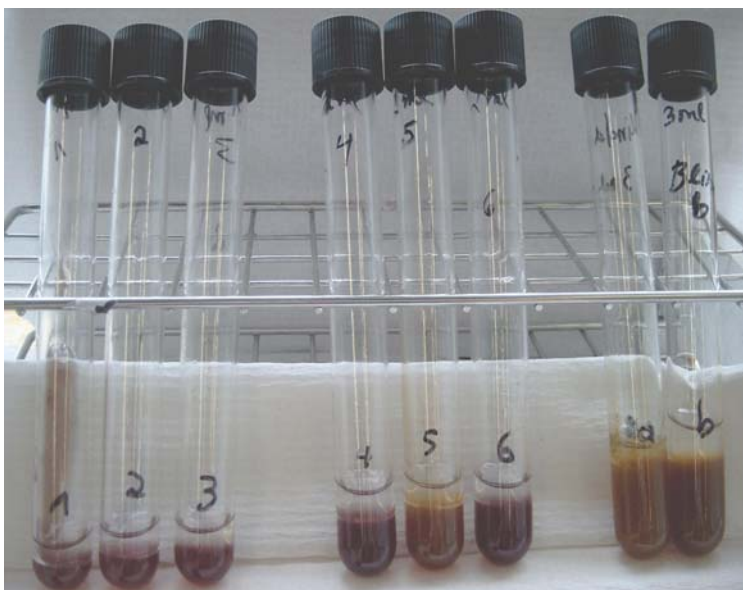


Abbildung 5.36: Beispiel eines Hemmstofftests

Die Hemmtests mit Gülle wurden grundsätzlich analog zu den Hemmtests mit Wasser durchgeführt. In den Teströhrchen befanden sich standardmäßig 2 mL Nähragar. Statt 1 mL einer wässrigen Antibiotikalosung wurde auf den bakterienhaltigen Nähragar im Teströhrchen mit einer Einwegpipette 2 mL einer mit Antibiotika dotierten Gülle pipettiert. Die Einwirkzeit der Gülle betrug immer 30 Minuten. Jeder Hemmtest wurde als Doppelansatz ausgeführt. Nach Ende der Einwirkzeit wurde die Gülle abgeschüttet, die Gulleruckstande auf dem Nähragar mit destilliertem Wasser abgespült und mit 1 bis 2 mL Paraffinöl überschichtet. Ist bei den Blindwerten (Durchführung mit undotierter Gülle) der Farbumschlag von violett nach gelb erfolgt, bei dem entsprechenden Teströhrchen aber nicht, hemmt das getestete Antibiotikum in dieser Konzentration.

## **5.9 Versuchsergebnisse der Hemmtests mit wässrigen Antibiotikalösungen**

Das Ziel der hier durchgeführten Hemmtests ist, die Schwellenkonzentration für jedes der getesteten Antibiotika zu bestimmen. Der bei diesem Test ermittelte Schwellenwert kann auch als Nachweisgrenze des Hemmstofftests für ein bestimmtes Antibiotikum bezeichnet werden. Zunächst wurden die Hemmtests mit wässrigen Antibiotikalösungen verschiedener Konzentrationen durchgeführt, um den Einfluss der Agarmenge im Teströhrchen und der verschiedenen Einwirkzeiten ohne die Störung durch die Güllematrix untersuchen zu können. In diesem Zusammenhang wurde die Hemmwirkung der Antibiotika Chlortetracyclin (CTC), Tetracyclin (TC) und Sulfadiazin (SDZ) untersucht. SDZ wurde in Kombination mit dem Synergisten Trimethoprim (TMP) betrachtet.

### **5.9.1 Chlortetracyclin in wässriger Lösung**

Die Hemmwirkung von CTC wurde in den Konzentrationen 200 mg/L, 50 mg/L und 25 mg/L getestet. Wie in Tabelle 5.16 zu sehen ist, wirkt CTC in einer Konzentration von 200 mg/L vollständig hemmend auf das Bakterienwachstum. Die Einwirkzeit der Antibiotikalosung hat bei der CTC-Konzentration von 200 mg/L keine Auswirkungen auf das Testergebnis. Enthält das Teströhrchen 3 mL Agar, wirkt CTC in der Konzentration 50 mg/L teilweise hemmend. Eine teilweise Hemmung bedeutet, dass die Bakterien weniger schnell wachsen und eine weniger starke Farbreaktion auslösen als der zugehörige Blindwert. Das Testergebnis wird bei einer Agarmenge von 3 mL im Teströhrchen und einer CTC-Konzentration von 50 mg/L nicht durch eine Variation der Einwirkzeit (EWZ) beeinflusst. Befinden sich nur 2 mL Agar im Teströhrchen ergibt sich bei einer EWZ von 15 und 30 Minuten eine teilweise Hemmung und bei einer EWZ von 60 Minuten eine vollständige Hemmung. Wirkt die Lösung mit 50 mg/L CTC auf die Teströhrchen mit einer Agarfüllung von 1 mL, ergibt sich eine vollständige Hemmung unabhängig von der EWZ der CTC-Lösung. Je weniger Agar sich im Testrohr-

chen befindet, desto empfindlicher reagiert das Testsystem bzw. desto eher wird eine Hemmung angezeigt.

Der Schwellenwert für wässrige CTC-Lösungen liegt im Bereich 25 - 50 mg/L.

Tabelle 5.16: Ergebnisse der Hemmtests mit wässriger CTC-Lösung

CTC Konz. [mg/L]	Agarmenge im Teströhrchen [mL]	Einwirkzeit [min]	Ergebnisse		
			Keine Hemmung	Teilweise Hemmung	Vollständige Hemmung
200	2	15			X
		30			X
		60			X
50	1	15			X
		30			X
		60			X
50	2	15		X	
		30		X	
		60			X
50	3	15		X	
		30		X	
		60		X	
25	2	15	X		
		30	X		
		60	X		
25	3	15	X		
		30	X		
		60	X		

### 5.9.2 Tetracyclin in wässriger Lösung

Die Hemmtests mit wässrigen TC-Lösungen wurden mit den Konzentrationen 500 mg/L, 250 mg/L, 125 mg/L und 62,5 mg/L durchgeführt. Die Ergebnisse der Hemmtests sind in Tabelle 5.17 zusammengefasst. Unabhängig von EWZ und Agarmenge im Teströhrchen bewirkt TC bei einer Konzentration von 500 mg/L eine vollständige Hemmung des mikrobiellen Wachstums. Bei einer Konzentration von 250 mg/L und einer Agarmenge von 2 mL hemmt TC das Bakterienwachstum vollständig und unabhängig von der Dauer der EWZ. Ist das Teströhrchen mit nur 1 mL Agar befüllt, wird das Bakterienwachstum bei einer EWZ von 30 und 60 min teilweise und bei einer EWZ von 15 min vollständig gehemmt. In den Konzentrationen 125 mg/L und 62,5 mg/L zeigt das Testsystem unabhängig von EWZ und Agarfüllung keine Hemmwirkung des bakteriellen Wachstums.

Der Schwellenwert für wässrige TC-Lösungen liegt im Bereich 125 - 250 mg/L.

Tabelle 5.17: Ergebnisse der Hemmtests mit wässriger TC-Lösung

TC Konz. [mg/L]	Agarmenge im Teströhrchen [mL]	Einwirkzeit [min]	Ergebnisse		
			Keine Hemmung	Teilweise Hemmung	Vollständige Hemmung
500	1	15			X
		30			X
		60			X
500	2	15			X
		30			X
		60			X
250	1	15			X
		30		X	
		60		X	
250	2	15			X
		30			X
		60			X
125	1	15	X		
		30	X		
		60	X		
125	2	15	X		
		30	X		
		60	X		
62,5	1	15	X		
		30	X		
		60	X		
62,5	2	15	X		
		30	X		
		60	X		

### 5.9.3 Sulfadiazin + Trimethoprim in wässriger Lösung

Die Hemmwirkung des Antibiotikums Sulfadiazin (SDZ) mit dem Synergisten Trimethoprim (TMP) wurde in den Sulfonamidkonzentrationen 800 mg/L (+ 200 mg TMP/L), 400 mg/L (+ 100 mg TMP/L) und 160 mg/L (+ 40 mg TMP/L) untersucht. Bei diesen Untersuchungen wurden ebenfalls die Einflüsse variierender Einwirkzeit der Antibiotikallösung und der Agarmenge im Teströhrchen betrachtet (Abbildung 5.37).



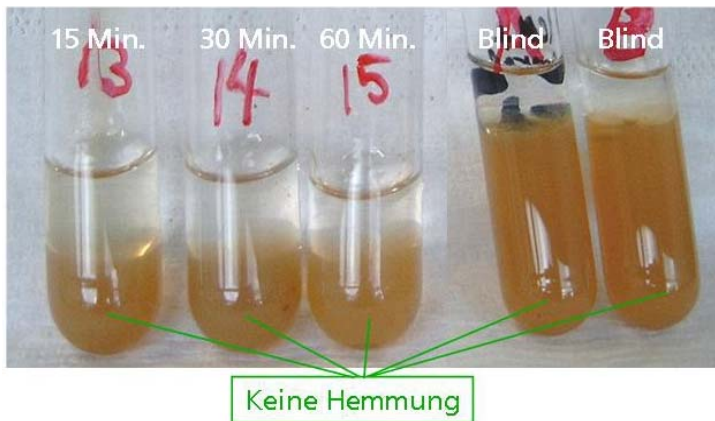


Abbildung 5.37: Foto der Versuchsauswertung für 400 mg SDZ/L (Agarmenge: 2 mL)

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 5.18 dargestellt. Bei einer SDZ-Konzentration von 800 mg/L und der Agarfüllung von 2 mL kann unabhängig von der EWZ keine Hemmung festgestellt werden. Wird die Agarmenge auf 1 mL reduziert, löst die Antibiotikalösung nach 15-minütiger EWZ eine teilweise Hemmung und bei 30 bzw. 60-minütiger EWZ eine vollständige Hemmung aus. Je weniger Agar sich im Teströhrchen befindet, desto empfindlicher reagiert also das Testsystem bzw. desto eher wird eine Hemmung angezeigt. Wird die Konzentration der betrachteten Antibiotikalösung auf 400 mg/L SDZ bzw. 160 mg/L SDZ verringert, ist unabhängig von EWZ und Agarfüllung im Teströhrchen keine Hemmwirkung zu beobachten. Der Schwellenwert für SDZ in wässrigem Milieu für diesen Hemmstofftest beträgt also 800 mg/L, wenn Teströhrchen mit einer Agarfüllung von 1 mL benutzt werden.

Der Schwellenwert für wässrige SDZ-Lösungen liegt für Teströhrchen mit einer Agarfüllung von 2 mL oberhalb von 800 mg/L.

Tabelle 5.18: Ergebnisse der Hemmtests mit wässrigen Lösungen von SDZ + TMP

SDZ Konz. [mg/L]	Agarmenge im Teströhrchen [mL]	Einwirkzeit [min]	Ergebnisse		
			Keine Hemmung	Teilweise Hemmung	Vollständige Hemmung
800	1	15		X	
		30			X
		60			X
800	2	15	X		
		30	X		
		60	X		
400	2	15	X		
		30	X		
		60	X		
400	3	15	X		
		30	X		
		60	X		
160	1	15	X		
		30	X		
		60	X		
160	2	15	X		
		30	X		
		60	X		
160	3	15	X		
		30	X		
		60	X		

#### 5.9.4 Zusammenfassung – Hemmtests mit wässrigen Antibiotikallösungen

Für die Übersicht der Versuche mit wässrigen Antibiotikallösungen sind in Tabelle 5.19 die Ergebnisse der durchgeführten Hemmtests tabellarisch zusammengefasst. Die experimentell ermittelten Schwellenwerte sind grau hinterlegt. Ergeben die Hemmtests unterschiedliche Hemmwirkungen in Abhängigkeit von variierender Agarmenge im Teströhrchen, wurde das Ergebnis des Tests mit den 2 mL Teströhrchen ausgewählt. Generell liefert eine Agarmenge von 2 mL ein zuverlässigeres Testergebnis als die Befüllung mit nur 1 mL. Generell neigen die Testergebnisse im Bereich der Schwellenwerte zu Streuungen. Nur in diesem Bereich ist ein Einfluss der Agarmenge und der EWZ auf das Testergebnis zu beobachten. Nach Betrachtung aller Ergebnisse der Hemmtests mit wässrigen Antibiotikallösungen wurde folgende optimale Parameterkonstellation gefunden: **30 min EWZ und 2 mL Agarfüllung pro Teströhrchen.**

Tabelle 5.19: Zusammenfassung der Hemmtests mit wässrigen Antibiotikallösungen

	<b>Antibiotika Konz. [mg/L]</b>	<b>Ergebnis</b>
<b>CTC</b>	200	Hemmung
	50	Hemmung
	25	keine Hemmung
<b>SDZ (+ TMP)</b>	800	keine Hemmung
	400	keine Hemmung
	160	keine Hemmung
<b>TC</b>	500	Hemmung
	250	Hemmung
	125	keine Hemmung
	62,5	keine Hemmung

## 5.10 Versuchsergebnisse der Hemmtests mit antibiotikadotierter Gülle

Aus den Ergebnissen der Hemmtests mit wässrigen Antibiotikallösungen ergab sich eine EWZ des antibiotikahaltigen Ansatzes von 30 Minuten. Diese EWZ erwies sich als ausreichend, um ein aussagefähiges Testergebnis zu erzielen. Die folgenden Hemmtests mit antibiotikadotierter Gülle wurden mit folgenden Antibiotika durchgeführt: CTC, TC, SDZ + TMP, SMZ + TMP, SDZ + SMZ + TMP. Die experimentell ermittelten Schwellenwerte sind in den Tabellen grau hinterlegt. Die Konzentrationsangaben in den Ergebnistabellen beziehen sich auf die feuchte Masse der Gülle (mg/kg). Da die Konsistenz der verwendeten Gullen verschieden war, wird in den Ergebnistabellen auch der Trockenrückstand der jeweiligen Gülle angegeben.

### 5.10.1 CTC-haltige Gülle

Die Hemmtests mit CTC-haltiger Gülle wurden mit den Konzentrationen 400 mg/kg, 200 mg/kg, 50 mg/kg und 25 mg/kg durchgeführt. Bei den Konzentrationen 400 mg/kg und 200 mg/kg tritt sowohl in den Teströhrchen mit 1 mL Agarfüllung als auch in denen mit 2 mL Agarfüllung eine vollständige Hemmung des Bakterienwachstums ein. Der Farbumschlag in den Teströhrchen mit nur 1 mL Agarfüllung ist schlechter zu erkennen als der in den 2 mL Teströhrchen. Die Folgeversuche wurden somit nur noch mit Teströhrchen mit einer Agarfüllung von 2 mL durchgeführt. Die Ergebnisse der Hemmtests mit CTC-haltiger Gülle sind in Tabelle 5.20 zusammengefasst.

Der Schwellenwert für CTC-haltige Gülle liegt im Bereich von 25 - 50 mg/kg.

Tabelle 5.20: Ergebnisse der Hemmtests mit CTC-haltiger Gülle

CTC Konz. [mg/kg Gülle]	TR Gülle [%]	Agarmenge im Teströhrchen [mL]	Ergebnisse		
			Keine Hemmung	Teilweise Hemmung	Vollständige Hemmung
400	2,5	1			<b>X</b>
400	2,5	2			<b>X</b>
200	2,5	1			<b>X</b>
200	2,5	2			<b>X</b>
50	3,5	2		<b>X</b>	
25	3,5	2	<b>X</b>		

### 5.10.2 TC-haltige Gülle

Die Hemmtests mit TC-haltiger Gülle wurden mit den Konzentrationen 500 mg/kg, 250 mg/kg, 125 mg/kg und 62,5 mg/kg durchgeführt. Bei allen Versuchen mit TC-haltiger Gülle, die in Tabelle 5.21 dargestellt sind, betrug der Trockenrückstand der verwendeten Gülle 3,5 %. Bei den Konzentrationen 500 mg/kg, 250 mg/kg und 125 mg/kg wird eine Hemmung des Bakterienwachstums ausgelöst. Für die Konzentration von 62,5 mg/kg ist eine teilweise Hemmung zu beobachten.

Demnach liegt der Schwellenwert für TC-haltige Gülle unterhalb von 62,5 mg/kg.

Tabelle 5.21: Ergebnisse der Hemmtests mit TC-haltiger Gülle

TC Konz. [mg/kg Gülle]	TR Gülle [%]	Agarmenge im Teströhrchen [mL]	Ergebnisse		
			Keine Hem- mung	Teilweise Hemmung	Vollständige Hemmung
500	3,5	2			<b>X</b>
250	3,5	2			<b>X</b>
125	3,5	2			<b>X</b>
62,5	3,5	2		<b>X</b>	

### 5.10.3 SDZ-haltige Gülle

Die Hemmtests mit SDZ-haltiger Gülle wurden in Kombination mit dem Synergisten Trimethoprim (TMP) mit den Konzentrationen 1000 mg/kg (+ 250 mg TMP/kg), 800 mg/kg (+ 200 mg TMP/kg) und 400 mg/kg (+ 100 mg TMP/kg) durchgeführt. Zur Vereinfachung wird in der folgenden Auswertung (Tabelle 5.22) die Hemmwirkung aufgrund der SDZ-Konzentration betrachtet. Bei einer SDZ-Konzentration von 1000 mg/kg wird eine vollständige Hemmung des Bakterienwachstums erreicht. Wird die Konzentration verringert

(800 mg/kg bzw. 400 mg/kg), lässt sich keine Hemmung des Bakterienwachstums beobachten. Der Farbumschlag in den Teströhrchen mit nur 1 mL Agarfüllung ist schlechter als in denen mit 2 mL zu erkennen. Aus diesem Grund werden die Folgeversuche nur noch mit einer Agarfüllung von 2 mL durchgeführt.

Der Schwellenwert für SDZ-haltige Gülle liegt im Bereich von 800 - 1.000 mg/kg.

Tabelle 5.22: Ergebnisse der Hemmtests mit SDZ-haltiger Gülle

SDZ Konz. [mg/kg Gülle]	TR Gülle [%]	Agarmenge im Teströhrchen [mL]	Ergebnisse		
			Keine Hemmung	Teilweise Hemmung	Vollständige Hemmung
1.000	3,5	2			<b>X</b>
800	2,5	1	<b>X</b>		
800	2,5	2	<b>X</b>		
400	2,5	1	<b>X</b>		
400	2,5	2	<b>X</b>		

#### 5.10.4 SMZ-haltige Gülle

Die Hemmtests mit SMZ-haltiger Gülle wurden in Kombination mit dem Synergisten TMP mit den Konzentrationen 400 mg/kg (+ 100 mg TMP/kg), 200 mg/kg (+ 50 mg TMP/kg) und 120 mg/kg (+ 30 mg TMP/kg) durchgeführt. Zur Vereinfachung wird in der folgenden Auswertung (Tabelle 5.23) die Hemmwirkung aufgrund der SMZ-Konzentration betrachtet. Eine Konzentration von 400 mg/kg hemmt das Bakterienwachstum vollständig. Bei einer reduzierten Konzentration von 200 mg/kg bzw. 120 mg/kg kann keine Hemmwirkung beobachtet werden.

Der Schwellenwert für SMZ-haltige Gülle liegt im Bereich von 200 - 400 mg/kg.

Tabelle 5.23: Ergebnisse der Hemmtests mit SMZ-haltiger Gülle

SMZ Konz. [mg/kg Gülle]	TR Gülle [%]	Agarmenge im Teströhrchen [mL]	Ergebnisse		
			Keine Hemmung	Teilweise Hemmung	Vollständige Hemmung
400	3,5	2			<b>X</b>
200	3,5	2	<b>X</b>		
120	3,5	2	<b>X</b>		

### 5.10.5 SDZ- und SMZ-haltige Gülle

Die Hemmtests mit SDZ- und SMZ-haltiger Gülle wurden mit den Sulfonamid-Konzentrationen 1000 mg/kg, 500 mg/kg und 300 mg/kg durchgeführt. Die Zusammensetzung von „SDZ + SMZ + TMP“ ist dabei für 1000 mg/kg „500 + 500 + 250“, für 500 mg/kg „250 + 250 + 125“ und für 300 mg/kg „150 + 150 + 75“. Ein Foto der Versuchsauswertung für die Konzentration 500 mg/kg ist in Abbildung 5.38 zu sehen.

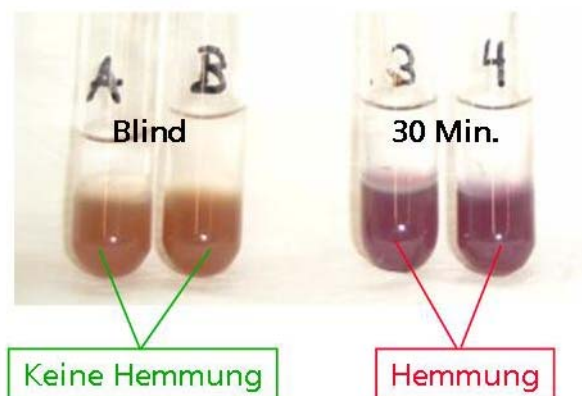


Abbildung 5.38: Foto der Versuchsauswertung für 500 mg SDZ+SMZ/kg (Agarmenge: 2 mL)

Zur Vereinfachung werden die in Tabelle 5.24 dargestellten Hemmtestergebnisse auf die gesamte Sulfonamidkonzentration bezogen. Alle getesteten Sulfonamidkonzentrationen lösen eine vollständige Hemmung des Bakterienwachstums aus.

Der Schwellenwert für Gülle, die mit dem Gemisch aus SDZ und SMZ dotiert wurde, liegt somit unterhalb von 300 mg/kg.

Tabelle 5.24: Ergebnisse der Hemmtests mit SDZ- und SMZ-haltiger Gülle

SDZ + SMZ Konz. [mg/kg Gülle]	TR Gülle [%]	Agarmenge im Teströhrchen [mL]	Ergebnisse		
			Keine Hemmung	Teilweise Hemmung	Vollständige Hemmung
1000	3,5	2			X
500	3,5	2			X
300	3,5	2			X

### 5.10.6 Zusammenfassung – Hemmtests mit antibiotikadotierter Gülle

Für einen Überblick über die durchgeführten Hemmtests mit antibiotikadotierter Schweinegülle sind in Tabelle 5.25 die Ergebnisse der durchgeführten Hemmtests tabellarisch zusammengefasst. Die experimentell ermittelten Schwellenwerte sind grau hinterlegt. Der Schwellenwert von CTC liegt bei den Versuchen mit wässrigen Antibiotikallösungen sowie bei den Versuchen mit antibiotikadotierter Gülle in einem Bereich von 25 - 50 mg/L bzw.

mg/kg. TC zeigt bei den Versuchen mit antibiotikadotierter Gülle einen Schwellenwert unterhalb von 62,5 mg/kg. Bei den Hemmtests mit wässrigen Antibiotikallösungen wies TC einen Schwellenwert im Bereich von 125 - 250 mg/L auf. Für SDZ konnte bei den Tests mit wässrigen Antibiotikallösungen kein Schwellenwert ermittelt werden. Die höchste getestete SDZ-Konzentration lag bei 800 mg/L. Bei den Tests mit antibiotikadotierter Gülle konnte der Schwellenwert für SDZ im Bereich von 800 - 1.000 mg/kg festgelegt werden. Der Schwellenwert von SMZ liegt hingegen im Bereich von 200 - 400 mg/kg. SMZ zeigt also eine stärkere Hemmwirkung als SDZ. Wird Gülle mit SDZ und SMZ zu gleichen Teilen dotiert, verstärken sich die beiden Sulfonamide in ihrer Hemmwirkung. Der Schwellenwert liegt dann unterhalb von 300 mg/kg. Die in diesen Hemmtests experimentell bestimmten Schwellenwerte bestätigen die aus der Literatur bekannte Tendenz, dass Sulfonamide eine geringere Hemmwirkung als Tetracycline aufweisen.

Tabelle 5.25: Zusammenfassung der Hemmtests mit antibiotikadotierter Gülle

<b>Antibiotikum</b>	<b>Konzentration [mg/kg Gülle]</b>	<b>TR Gülle [%]</b>	<b>Ergebnis</b>
<b>CTC</b>	400	2,5	Hemmung
	200	2,5	Hemmung
	50	3,5	Teilweise Hemmung
	25	3,5	Keine Hemmung
<b>TC</b>	500	3,5	Hemmung
	250	3,5	Hemmung
	125	3,5	Hemmung
	62,5	3,5	Teilweise Hemmung
<b>SDZ (+ TMP)</b>	1000	3,5	Hemmung
	800	2,5	Keine Hemmung
	400	2,5	Keine Hemmung
<b>SMZ (+ TMP)</b>	400	3,5	Hemmung
	200	3,5	Keine Hemmung
	120	3,5	Keine Hemmung
<b>SDZ +SMZ (+TMP)</b>	1000	3,5	Hemmung
	500	3,5	Hemmung
	300	3,5	Hemmung

Es wurde gezeigt, dass der Matrixeffekt der Gülle keine gravierenden Auswirkungen bei den Testergebnissen hervorbringt. Lediglich Röhrchen mit einer Agarfüllung von 1 mL können nicht für diesen Schnelltest eingesetzt werden, weil hier der Farbumschlag schlecht zu erkennen ist. Denn im Gegensatz zu den Hemmtests mit wässrigen Antibiotikallösungen färbt die Gülle den Agar im Teströhrchen leicht bräunlich an. Bei der Durchführung ist es wichtig, den antibiotikahaltigen Gülleansatz mit Wasser abzuspuhlen, da sonst das Wachstum der Bakterienmischkultur in der Gülle begünstigt werden kann. In Abbildung 5.39 sind zwei Teströhrchen mit dem gefärbten Nähragar zu sehen, welcher nicht mit *C. thermobutyricum* ange-

impft wurde. Beide Röhren wurden mit undotierter Gülle bedeckt, nach 30 Minuten EWZ abgospult und inkubiert. Dabei ist R2 unverändert violett, in R1 sind aber ein beginnender Farbumschlag und eine deutliche Gasbildung zu beobachten. Diese Reaktion wurde von thermophilen Mischkulturen aus der Gülle ausgelöst. Das Testergebnis wird jedoch durch diese Mischkulturen nicht beeinflusst, da die Wachstumsbedingungen im beimpften Teströhrchen für *C. thermobutyricum* optimiert wurden. Daher wird das Wachstum von *C. thermobutyricum* begünstigt und der Einfluss von eventuell in der Gülle vorhandenen thermophilen Mischkulturen kann vernachlässigt werden.



Abbildung 5.39: Referenztestrohrchen ohne *C. thermobutyricum* nach uberschichtung mit undotierter Gülle

Für die Überprüfung der Mindesthaltbarkeit des Hemmstofftests wurden Rückstellproben der verschiedenen hergestellten Chargen bei 5 °C gelagert. Die Überprüfung der Funktionsfähigkeit am Ende des Forschungsvorhabens ergab eine Mindesthaltbarkeit der Teströhrchen von 10 Monaten.



## 5.11 Standardisierte Arbeitsanweisung für die Durchführung des Hemmstofftests

### Vorbereitung

- (1) Entnahme der benötigten Röhrrchen aus dem Kühlschrank.
- (2) Vorbereitung des Antibiotika-Standards.
- (3) Homogenisierung der zu untersuchende Gülleprobe durch Schütteln.

### Durchführung des Hemmstofftests

- (1) Jeweils 2 mL der homogenisierten Gülle in ein Röhrrchen pipettieren (Doppelansatz).
- (2) Für jede Probe eine neue Einwegpipette verwenden.
- (3) 2 mL des Antibiotika-Standards in ein Röhrrchen pipettieren (Doppelansatz).
- (4) 2 mL Leitungswasser in ein Röhrrchen pipettieren (Doppelansatz).
- (5) Sofortiges Verschließen der Röhrrchen nach jedem Pipettieren.
- (6) Die Proben 30 Minuten im Kühlschrank eindiffundieren lassen.
- (7) Die Proben abschütten und mit Leitungswasser abspülen.
- (8) Die Röhrrchen mit 2 mL Paraffinöl überschichten und sofort wieder verschließen.
- (9) Die Röhrrchen im Thermoblock bei 55 °C bebrüten, bis die Negativ-Kontrolle vollständig nach gelb entfärbt ist (ca. 7,5 h).

### Auswertung des Hemmstofftests

Eine korrekte Auswertung ist nur dann möglich, wenn die mitgeführten Positiv- und Negativ-Kontrollen korrekt reagiert haben. Alle Röhrrchen, die einen Farbton aufweisen, der eindeutig von dem Farbton der Negativ-Kontrolle unterscheidbar ist, werden als positiv bzw. verdächtig bezeichnet.

## 5.12 Vergleich mit einem Brillantschwarzreduktionstest

Für den Vergleich des hier entwickelten Hemmstofftests mit einem Brillantschwarzreduktionstest (BRT) wurden Versuche mit dem Schnelltest zur Analytik in Milch der Firma AiM durchgeführt. Die Ergebnisse des Tests ohne Vordiffusion mit antibiotikahaltiger Gülle sind in Tabelle 5.26 dargestellt. Die Schwellenwerte sind grau hinterlegt. Für CTC und TC ist schon bei sehr geringen Konzentrationen eine Hemmwirkung zu beobachten. Die Schwellenwerte liegen im Bereich von 2,9 - 3,1 bzw. 6,9 - 7,3 mg/kg. Das dritte untersuchte Tetracyclin OTC bewirkt im Bereich von 250 - 333 mg/kg eine Hemmung. Die Schwellenwerte der Sulfonamide SDZ und SMZ liegen innerhalb der Bereiche 1.800 - 1.820 bzw. 1.700 - 1.720 mg/kg. Werden SDZ und SMZ zu gleichen Teilen kombiniert und hinsichtlich ihrer Hemmwirkung untersucht, liegt der Schwellenwert im Bereich von 3.600 - 3.640 mg/kg. Dies bedeutet, dass die Hemmwirkung von SMZ geringfügig nachlässt, wenn es mit SDZ gemeinsam zugegeben wird.

Der für die Güllematrix eigentlich besser geeignete Test mit Vordiffusion konnte aus labor-technischen Gründen nur mit wässrigen Antibiotikallösungen untersucht werden. In Tabelle 5.27 sind die Ergebnisse für SDZ, CTC und TC aufgelistet. Die Ergebnisse sind durchaus mit den Versuchen ohne Vordiffusion mit dotierten Gülleproben vergleichbar. Für SDZ konnte bei den Konzentrationen 10 und 25 mg/L keine Hemmwirkung beobachtet werden. CTC zeigte eine hemmende Wirkung bei 4 mg/L und keine Hemmung bei 2 mg/L. Dies wird durch den Schwellenwert des Testsystems ohne Vordiffusion, der in dem Bereich von 2,9 - 3,1 mg/kg liegt, bestätigt. Beide untersuchten TC-Konzentrationen (5 und 12,5 mg/L) wirkten hemmend. Da der Schwellenwert für das Testsystem ohne Vordiffusion für TC aber im Bereich von 6,9 - 7,3 mg/kg liegt, sollte die Konzentration von 5 mg/L nicht hemmend wirken.

Tabelle 5.26: Hemmwirkung von dotierter Gülle (BRT ohne Vordiffusion)

Hemmstoff	Konzentration [mg/kg Gülle]	Ergebnisse		
		Keine Hemmung	verdächtig	Hemmung
<b>CTC</b>	5			<b>x</b>
	3,6			<b>x</b>
	3,1		<b>x</b>	
	2,9	<b>x</b>		
<b>TC</b>	10			<b>x</b>
	7,8		<b>x</b>	
	7,3		<b>x</b>	
	6,9	<b>x</b>		
<b>OTC</b>	500			<b>x</b>
	333			<b>x</b>
	250	<b>x</b>		
<b>SDZ (+ TMP)</b>	1.860			<b>x</b>
	1.820			<b>x</b>
	1.800	<b>x</b>		
	1.760	<b>x</b>		
<b>SMZ (+ TMP)</b>	1.760			<b>x</b>
	1.720			<b>x</b>
	1.700	<b>x</b>		
	1.660	<b>x</b>		
<b>SDZ + SMZ (+ TMP)</b>	1.860 + 1.860			<b>x</b>
	1.820 + 1.820			<b>x</b>
	1.800 + 1.800	<b>x</b>		
	1.760 + 1.760	<b>x</b>		
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	400			<b>x</b>
	300		<b>x</b>	
	240		<b>x</b>	
	200	<b>x</b>		

Tabelle 5.27: Hemmwirkung von wässrigen Antibiotikallösungen (BRT mit Vordiffusion)

Hemmstoff	Konzentration [mg/L Wasser]	Ergebnisse	
		Keine Hemmung	verdächtig    Hemmung
SDZ	10	x	
	25	x	
CTC	2	x	
	4		x
TC	5		x
	12,5		x

Zusätzlich zu dem analytischen Vergleich von realen und dotierten Gülleproben im Rahmen des internen Laborvergleichs (Ergebnisse des Ringversuchs in Kapitel 5.2) wurden die Proben mit Hilfe des BRTs ohne Vordiffusion auf ihre Hemmwirkung untersucht. Da die Konzentration an Hemmstoffen durchweg relativ gering war, wurden nur die TC-Konzentrationen aus dem Laborvergleich als Anhaltspunkt für die zu erwartende Hemmwirkung verwendet. Lediglich Probe 5 weist einen signifikanten Gehalt an CTC auf und beeinflusst damit auch das Testergebnis. In der Ergebnisdarstellung in Tabelle 5.28 sind die Analysenergebnisse von TiHo und IUTA gegenübergestellt. Bei stark abweichenden Ergebnissen wurde die höhere Konzentration für die Bewertung ausgewählt. Zusätzlich zu den unverdünnten und 1:10 verdünnten Proben wurden noch Verdünnungen von 1:100 und 1:1000 untersucht. Hier konnte bei keinen der betrachteten Proben eine Hemmwirkung festgestellt werden.

Tabelle 5.28: Hemmwirkung der Gülleproben aus dem Ringversuch (BRT ohne Vordiffusion)

Probe	Verdünnung	Konz. TC (TiHo) [mg/kg Gülle]	Konz. TC (IUTA) [mg/kg Gülle]	Ergebnis BRT	Bewertung
Probe 1	unverdünnt 1:10	3,2	1,4	Hemmung keine Hemmung	Falsch Richtig
Probe 2	unverdünnt 1:10	94	109	verdächtig keine Hemmung	Richtig Falsch
Probe 3	unverdünnt 1:10	2,5	2,8	verdächtig keine Hemmung	Falsch Richtig
Probe 4	unverdünnt 1:10	2,1	2,9 (CTC 3,4)	Hemmung keine Hemmung	Richtig Richtig
Probe 5	unverdünnt 1:10	12	14	verdächtig keine Hemmung	Richtig Richtig
Probe 6	unverdünnt 1:10	1,2	9,2	Hemmung keine Hemmung	Richtig Richtig
Probe 7	unverdünnt 1:10	0,9	1,2	Hemmung keine Hemmung	Falsch Richtig
Probe 8	unverdünnt 1:10	< 0,02	< 0,3	verdächtig keine Hemmung	Falsch Richtig
Probe 9	unverdünnt 1:10	4,9	8,9	verdächtig keine Hemmung	Richtig Richtig
Probe 10	unverdünnt 1:10	< 0,02	< 0,3	keine Hemmung keine Hemmung	Richtig Richtig
Probe 11	unverdünnt 1:10	9,8	35	keine Hemmung keine Hemmung	Falsch Richtig
Probe 12	unverdünnt 1:10	0,08	< 0,3	Hemmung keine Hemmung	Falsch Richtig

Der Vergleich des BRTs mit dem hier entwickelten Hemmstofftest zeigt die notwendige Adaption des Testsystems an die Güllematrix. Da der Hemmstofftest speziell für Gülle und deren Wirkung in der Biogasanlage entwickelt wurde, liegen die damit erzielten Schwellenwerte näher an den Vorgaben der Gärtests. Die Schwellenwerte des BRTs liegen lediglich für OTC in dem vorgegebenen Bereich. Auch der Vergleich der Schwellenwerte des BRTs mit den Ergebnissen des Ringversuchs zeigt, dass die Aussagen zur Hemmwirkung nicht uneingeschränkt auf reale Gülleproben übertragbar sind.

## 6 Diskussion und Ausblick

### 6.1 Stabilitätsversuche

Die Untersuchungen zur Stabilität ausgewählter Antibiotika in Gülle zeigen deutlich, dass auch nach langen Lagerungszeiten aufgrund der Persistenz der Substanzen mit dem Eintrag von Roxithromycin, Tiamulin, Sulfonamiden und Tetracyclinen in die Biogasanlage gerechnet werden muss. Nachfolgend sind ergänzend zu den in Kapitel 5.3 aufgeführten Einzelwerten die Halbwertszeiten für die wichtigsten Substanzklassen zusammengefasst (Tabelle 6.1).

Tabelle 6.1: Halbwertszeiten ausgewählter Antibiotika in Gülle

<b>Substanzklasse</b>	<b>Halbwertszeit</b>	<b>Literatur</b>
Penicilline und Cephalosporine	< 2 Tage	Alexander 2004 {Suter, 1997 #202}
Salinomycin	ca. 6 Tage	Schlüsener 2006 {Martinez-Carballo, 2007 #200}
<b>Trimethoprim</b>	ca. 20 - 40 Tage	diese Arbeit
Erythromycin	ca. 41 Tage	Schlüsener 2006 {Suter, 1997 #202}
Roxithromycin	ca. 160 Tage	Schlüsener 2006 {Wellinger, 1991 #211}
<b>Sulfonamide:</b>	ca. 200 - 500 Tage	diese Arbeit
<b>Tetracycline</b>	> 250 Tage	diese Arbeit
Tiamulin	kein Abbau nach 200 Tagen	Schlüsener 2006 {Engels, 2004 #93}

### 6.2 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Als Grundlage zur Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von potenziellen Hemmstoffen mittels Gärtests diente die gesamte Menge des entstehenden Gases. In ausgewählten Versuchen wurde zusätzlich die Zusammensetzung der beim Gärprozess entstehenden Gase überwacht und auf die Einzelkomponenten Methan, Stickstoff, Sauerstoff und Kohlendioxid analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass der Anteil von Methan im Gas gleich bleibt, unabhängig davon, ob eine Hemmwirkung (der gesamten Gasbildung) vorliegt, oder nicht. Somit kann das Maß für eine Hemmwirkung an der gesamten Menge des entstehenden Gases festgelegt werden. Als Grundlage zur Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Hemm-

stoffen mittels Gärtests wurde dementsprechend die gesamte Menge des entstehenden Gases betrachtet. Die Hemmwirkung von CTC und TC liegt im Bereich von 125 - 500 mg/kg, was einer Größenordnung entspricht, die in anderen Untersuchungen {Grote, 2005 #173} von belasteten Gülleproben ermittelt wurde. Die Hemmwirkung von SDZ liegt in einem Bereich von 750 - 1.000 mg/kg, die von SMZ bei 150 - 210 mg/kg. Für diese Wirkstoffe liegen die Maximalwerte aus Literaturquellen für das Vorkommen in Gülle bei 235 mg/kg bzw. 167 mg/kg. Somit sind bei sachgemäßer Applikation von SDZ keine Störungen der Biogasproduktion zu erwarten. Die Maximalkonzentration von SMZ hingegen liegt in dem Bereich, der möglicherweise hemmend auf den Biogasprozess wirken kann.

Werden Gülleproben betrachtet, die zu gleichen Teilen mit SDZ und SMZ dotiert wurden, lässt sich eine Beeinflussung auf die Hemmwirkung von SMZ feststellen. Im Gärtest wurde von SDZ bei einer Konzentration von 1.000 mg/kg eine Hemmung von 20 %, von SMZ mit einer Konzentration von 210 mg/kg eine Hemmung von 25 % verursacht. Bei der Kombination der beiden Sulfonamide von jeweils 200 mg/kg wird lediglich eine Hemmung von 13 % hervorgerufen. Die Hemmwirkung von SMZ verringerte sich also im Gärtest in der Kombination mit SDZ. Dies wird durch die Ergebnisse des Hemmstofftests bestätigt. Hier liegt der Schwellenwert für SMZ zwischen 200 und 400 mg/kg. In der Kombination mit SDZ verändert sich der Bereich des Schwellenwerts und liegt unterhalb von 150 mg/kg. Lediglich mit dem Brillantschwarzreduktionstest ist eine Erhöhung des Schwellenwertes für SMZ in Kombination mit SDZ zu beobachten. Der Schwellenwert für SMZ liegt hier oberhalb von 1.720 mg/kg, für SDZ + SMZ oberhalb von 1.820 mg/kg.

Neben den Tetracyclinen und ggf. Sulfamethazin sollte zur Vermeidung von Betriebsstörungen das Vorkommen der Antibiotika Bacitracin, Lincomycin, Monensin, Spiramycin, Tylosin und Virginiamycin im Gärsubstrat beachtet werden.

Für das z. B. bei der Klauendesinfektion eingesetzte Kupfersulfat wurde ein Schwellenwertbereich von 600 - 1.250 mg/kg festgestellt. Bei der ordnungsgemäßen Klauendesinfektion und durch die Bildung von CuS im Gülletank sollte somit keine Beeinflussung der Biogasproduktion entstehen. Ein im Rahmen dieses Forschungsprojektes untersuchtes Fallbeispiel zeigte allerdings, dass im Einzelfall eine signifikante Reduktion der Biogasproduktion stattfinden kann. Bei Verwendung von Gülle aus einem Bullenstall mit einer  $\text{CuSO}_4$ -Konzentration von 200 mg/kg wurden keine Störungen beobachtet. Wurde dagegen die Gülle aus einem Kuhstall eingesetzt, trat eine Reduktion von ca. 30 % der Biogasausbeute auf. In besagtem Kuhstall wurde das Desinfektionsmittel MEGADES mit quartären Ammoniumverbindungen und Aldehyden als Hauptwirkstoffen sowie  $\text{CuSO}_4$  zur Klauendesinfektion angewendet. Mit einer Konzentration von 4.770 mg/kg  $\text{CuSO}_4$  wurde der Schwellenwert

deutlich überschritten. Darüber hinaus konnten von den Desinfektionsmittel-Wirkstoffen keine signifikanten Konzentrationen in der Gülle nachgewiesen werden. Somit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Anlagenstörung durch die massive  $\text{CuSO}_4$ -Anwendung im Kuhstall aufgetreten ist.

Auch der negative Einfluss von quartären Ammoniumverbindungen (QAV) auf die Biogasproduktion konnte mit den durchgeführten Gärtests nachgewiesen werden. Für die QAVs wurde der Schwellenwert für eine signifikante Hemmung im Bereich von 75 - 150 mg/kg festgelegt. In Einzelmessungen konnten Gehalte in gleicher Größenordnung von QAVs in Gärrückständen nachgewiesen werden. QAVs sind als Desinfektionsmittel oder als Zusätze in Körperpflege-Artikeln (z. B. in Shampoo) weit verbreitet. In den letzten Jahren wurden zunehmend Untersuchungen in Oberflächengewässern, Sedimenten oder Kläranlagenzuläufen bzw. -abläufen zum Nachweis von QAVs durchgeführt. Wegen ihrer amphiphilen Eigenschaften adsorbieren QAVs an Feststoffen und reichern sich beispielsweise in Klärschlämmen an. Am häufigsten und in höheren Konzentrationsbereichen wird BAC-C12 nachgewiesen. Unter anaeroben Bedingungen sind QAVs nicht biologisch abbaubar. Diese Eigenschaft konnte durch eigene Untersuchungen bestätigt werden, da keine Verringerung der QAV-Gehalte während des Fermentationsprozesses festgestellt werden konnte.

Für das in diesem Projekt erstmals untersuchte Triclosan fehlen derzeit noch Vergleichswerte in Gülle. Ab Konzentrationen von 65 mg/kg ist mit einer signifikanten Hemmung der Biogasproduktion zu rechnen.

Entsprechend der Zusammenfassung von Wellinger muss darüber hinaus bei der Anwendung und somit dem Vorkommen der Desinfektionsmittel Dekaseptol, Durosept, Incidin anticoc sowie Lysococ im Gärsubstrat ebenfalls mit einer signifikanten Reduktion der Biogasproduktion gerechnet werden.

### **6.3 Eliminations- / Abbauverhalten und Bildung von Metaboliten**

Mit den neu entwickelten Messmethoden konnte das Verhalten der zudotierten Antibiotika über die Versuchsdauer von bis zu fünf Wochen untersucht und einzelne Metaboliten detektiert werden. Gärtests im 5-L-Fermenter mit Sulfonamiden in niedrigen Konzentrationen zeigten eine nahezu vollständige Elimination von vier der sieben untersuchten Substanzen (SDZ, SMR, SMX und SDM, siehe Kapitel 5.5.2, Abbildung 5.23). Für SDZ konnte die molekulare Struktur eines Metaboliten eindeutig identifiziert und die Konzentration halbquantitativ bestimmt werden. Mit zunehmender Fermentationsdauer wurde ein Konzentrationsanstieg dieses Metaboliten festgestellt. In begleitenden Hemmstoffuntersuchungen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die mikrobiologische Hemmwirkung des gebildeten Metaboliten

unterhalb von 10 % im Vergleich zur Ausgangssubstanz SDZ liegt und somit für die Biogasanlagen kein Problem mehr darstellt. Im Falle des SDZ hat somit ein Abbau stattgefunden. Vergleicht man die molekularen Strukturen von SDZ, SMR und SMZ, so ist ein strukturabhängiger Abbau zu erkennen. SMZ, welches in allen Versuchsabsätzen keinen Abbau zeigte, weist im Gegensatz zu SDZ und SMR zwei Methylgruppen am Pyrimidinring auf, die eine Hydroxylierung, wie im Falle des SDZ verhindern.

Für CTC konnten die Iso-Form und sein Epimer quantitativ bestimmt werden, da es für diese Substanz Referenzstandards gibt. Die Untersuchungsergebnisse deuten auf eine schnelle und fast quantitative Umwandlung der Muttersubstanz hin. Im Gegensatz dazu zeigte TC eine ca. 70%ige Elimination; Metabolite wurden nicht gefunden.

Der Verbleib der anderen eliminierten Antibiotika konnte in diesem Forschungsvorhaben nicht abschließend geklärt werden, da keine substanzspezifischen Metaboliten identifiziert werden konnten. Insofern kann auch eine Sorption der Wirkstoffe z. B. an Güllepartikel derzeit nicht ausgeschlossen werden.

#### **6.4 Entwicklung des Hemmstofftests**

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens ist es gelungen, einen anaeroben Hemmstofftest auf der Basis eines Agardiffusionstests zu entwickeln. Da Mischkulturen schlecht einstellbar und reproduzierbar für den Einsatz in einem mikrobiellen Hemmstofftest sind, erfolgte die Beschränkung auf Reinkulturen. Der Testkeim *C. thermobutyricum* ist geeignet, um das Verhalten der Mischkultur in einer Biogasanlage im Hinblick auf ihre Antibiotikaempfindlichkeit im Testsystem abzubilden. Dieser Hemmstofftest macht es möglich, eine qualitative Ja/Nein-Aussage über den Hemmstoffgehalt von Gülle zu treffen, welche als Substrat in einer Biogasanlage eingesetzt werden soll. Da sich die Testentwicklung mit anaeroben Bakterien im Rahmen des Vorhabens als technisch weitaus aufwändiger und zeitintensiver herausstellte, als beim Zeitpunkt der Antragstellung abzusehen war, konnten lediglich orientierende Versuche zur Validierung des Hemmstofftests durchgeführt werden.

##### **6.4.1 Optimierung des Herstellungsverfahrens der Teströhrchen**

Die Qualität und die Ansprechzeit der Teströhrchen sind abhängig von der Agarmenge und der Sporenkonzentration im Teströhrchen sowie von der Dauer der Einwirkzeit (EWZ) der zu untersuchenden Probe. Der **Einfluss der Agarmenge** im Teströhrchen wurde hauptsächlich bei den Versuchen mit wässrigen Antibiotikallösungen untersucht. Bei diesen Versuchen ließ sich die Tendenz feststellen, dass eine geringere Agarmenge im Teströhrchen zu einer früheren Hemmung führt. Lediglich die Versuche mit wässriger TC-Lösung der Konzentration



250 mg/L zeigten eine gegensätzliche Tendenz. Bei den Hemmtests mit antibiotikadotierter Gölle erwies sich eine Agarfüllung von nur 1 mL als ungeeignet, da der Farbumschlag schlechter zu erkennen war und die Ergebnisse instabil waren. Daher werden 2 mL als optimal für die Herstellung der Teströhrchen angesehen. Es zeigte sich, dass die Variation der Agarmenge im Teströhrchen einen stärkeren Einfluss auf das Testergebnis hat, als die EWZ.

Die **Dauer der Einwirkzeit** des antibiotikahaltigen Ansatzes hat nur im Bereich des Schwellenwerts eine Auswirkung auf das Testergebnis. Generell ließ sich die Tendenz feststellen: Je kürzer die EWZ, desto höher der Schwellenwert. Lediglich die Versuche mit wässriger TC-Lösung der Konzentration 250 mg/L zeigten eine gegensätzliche Tendenz. Durch die Variation der EWZ kann der Schwellenwert in geringem Maße nach oben oder unten korrigiert werden.

Die **Sporenkonzentration** beeinflusst die Reaktionszeit (bzw. Inkubationszeit der Teströhrchen) des Testsystems und die Stabilität der Testergebnisse. Dabei gilt: Je mehr Sporen sich im Teströhrchen befinden, desto kürzer ist die Inkubationszeit des Testsystems. Die Keim- bzw. Sporenanzahl leitet sich grundsätzlich von der Keim- bzw. Sporenanzahl der Bakterienlösung ab, die zur Herstellung der Röhrchen verwendet wurde. Da die Lebensfähigkeit der Sporen durch den Herstellungsprozess nicht beeinträchtigt wird, kann die Sporenkonzentration im Teströhrchen mit der Sporenkonzentration in der Bakteriensuspension näherungsweise gleichgesetzt werden.

Bei einer Sporenkonzentration von ca. 40 Sporen/mL und einer Lebendkeimzahl von  $6 \cdot 10^4$  KBE/mL ergab sich eine Inkubationszeit von 14 Stunden. Durch eine Erhöhung der Sporenkonzentration auf ca. 280 Sporen/mL (Lebendkeimzahl  $5 \cdot 10^4$  KBE/mL) konnte die Inkubationszeit auf 7,5 Stunden reduziert werden. Bei einem Vergleich von Sporen und Keimzahlkonzentrationen der 7,5-Stunden-Teströhrchen mit denen der 14-Stunden-Teströhrchen wird ersichtlich, dass die Reduktion der Inkubationsdauer allein auf der Erhöhung des Sporenanteils beruht. Dies lässt die Vermutung zu, dass die vegetativen Zellen den Immobilisierungsprozess bei der Herstellung des Testsystems nicht überleben. Durch die weitere Erhöhung der Sporenkonzentration in den Teströhrchen ist eine nochmalige Verringerung der Inkubationszeit möglich.

#### 6.4.2 Anwendung des Hemmstofftests mit wässrigen Antibiotikallösungen und antibiotikadotierter Gülle

Die Hemmtests mit wässrigen Antibiotikallösungen wurden durchgeführt, um das generelle Verhalten des Testsystems zu bestimmen, ohne dass die Ergebnisse vom Matrixeffekt der Gülle beeinflusst werden. Im Hinblick auf die praktische Anwendung des Testsystems sind die Schwellenwerte aussagekräftiger, die in den Hemmtests mit antibiotikadotierter Gülle ermittelt wurden. Bei der Durchführung der Hemmtests mit antibiotikadotierter Gülle ergibt sich ein entscheidender Unterschied zu den Hemmtests mit wässrigen Antibiotikallösungen. Die Gülle muss nach der Einwirkzeit mit Wasser abgespült werden, damit das Testergebnis nicht durch die Matrix und die Mischkulturen in der Gülle verfälscht wird. In Tabelle 6.2 werden die in beiden Hemmtestreihen ermittelten Schwellenwerte einander gegenübergestellt. Die Konzentrationsangaben beziehen sich für SDZ + TMP nur auf die Sulfonamidkonzentration.

Tabelle 6.2: Vergleich der Schwellenwerte aus Hemmtests mit wässrigen Antibiotikallösungen und Hemmtests mit antibiotikadotierter Gülle

<b>Antibiotikum</b>	<b>Hemmtests mit wässrigen Antibiotikallösungen [mg/L]</b>	<b>Hemmtests mit antibiotikahaltiger Gülle [mg/kg]</b>
CTC	25 - 50	25 - 50
TC	125 - 250	< 62,5
SDZ + TMP	> 800	800 – 1.000

Bei dem Vergleich fällt auf, dass nur die Schwellenwerte der Versuche mit TC stärker voneinander abweichen. Der Schwellenwert, der für TC in antibiotikadotierter Gülle bestimmt wurde, liegt unterhalb von 62,5 mg/kg und damit außerhalb des Bereichs von 125 - 250 mg/L für die wässrigen TC-Lösungen. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass bei den Versuchen mit CTC und SDZ eine andere Gülle als bei den Versuchen mit TC verwendet wurde. Bei den Versuchen mit CTC und SDZ liegen die Schwellenwerte im gleichen Bereich. Sie werden nicht vom Matrixeffekt der Gülle beeinflusst.

### 6.4.3 Vergleich der Ergebnisse von Gärtest und Hemmstofftest

Die mit dem hier entwickelten Hemmstofftest erzielten Schwellenwerte sollten den Schwellenwerten entsprechen, die im Gärtest erzielt wurden (Tabelle 6.3). Die Konzentrationsangaben beziehen sich für die Substanzen: SDZ + TMP, SMZ + TMP und SDZ + SMZ + TMP immer auf die Sulfonamidkonzentration.

Tabelle 6.3: Vergleich der Schwellenwerte aus Gärtest und Hemmstofftest

Hemmstoff	Gärtest [mg/kg Gülle]	Hemmstofftest [mg/kg Gülle]	BRT [mg/kg Gülle]
CTC	125 - 250	25 - 50	> 3,1
TC	125 - 250	< 62,5	> 7,3
OTC	250 - 500	n.b.	> 333
SDZ (+ TMP)	750 - 1000	800 - 1000	> 1820
SMZ (+ TMP)	150 - 210	200 - 400	> 1720
SDZ + SMZ (+TMP)	> 400	< 300	> 3640
CuSO <sub>4</sub>	600 - 1.250	n.b.	> 240

n.b.: nicht bestimmt

Liegen die im Hemmstofftest erzielten Schwellenwerte unterhalb der im Gärtest ermittelten Schwellenwerte, kann dies im Bereich von 100 mg/kg als zusätzlicher Sicherheitsaufschlag angesehen werden. Liegt der Schwellenwert im Hemmstofftest aber oberhalb des ermittelten Bereichs, muss die Aussage des Hemmstofftestes durch entsprechende Modifikationen an die Vorgabe des Gärtestes angepasst werden.

Die Schwellenwerte welche im Hemmstofftest für CTC und TC ermittelt wurde, könnten nach oben korrigiert werden. Da CTC und TC in der Literatur aber als starke Hemmstoffe angegeben werden, ist ein niedriger Schwellenwert des Testsystems in Bezug auf diese Tetracycline durchaus von Vorteil.

Für SDZ wurde als maximale Konzentration 235 mg/kg und für den Metaboliten N<sup>4</sup>-Acetyl-Sulfadiazin 300 mg/kg in Gülle nachgewiesen. Somit liegen die Schwellenwert-Bereiche aus den Gärtests mit 750 - 1000 mg/kg und aus dem Hemmstofftest (800 - 1000 mg/kg) weit über den tatsächlich in Gülle gefundenen Konzentrationen. Der Schwellenwert-Bereich des Hemmstofftests liegt zudem in dem durch die Gärtests vorgegebenen Bereich.

#### **6.4.4 Annahmen zur Vergleichbarkeit von Gärtest und Hemmstofftest**

Gülle ist ein Stoff, welcher grundsätzlich eine komplexe Matrix darstellt. Beim Vergleich der Schwellenwerte von Gärtest und Hemmtest, fallen die unterschiedlich großen Trockenrückstände der verwendeten Güllen auf. Die Schwellenwerte der Hemmstofftests wurden mit zwei verschiedenen Güllen mit Trockenrückständen von 2,5 bzw. 3,5 % erzielt. Die Trockenrückstände der Güllen, die für die Gärtests verwendet wurden, schwankten zwischen 1,5 und 15 %. Die Schwankungen der Trockenrückstände, welche auf die Benutzung unterschiedlicher Güllechargen zurückzuführen sind, können das Testergebnis beeinflussen.

#### **6.5 Ausblick**

Die Ergebnisse des hier dargestellten Forschungsvorhabens zeigen, dass ein anaerober Hemmstofftest zur Überprüfung von Gülle entwickelt werden konnte. Die Inkubationszeit von 7,5 Stunden sollte durch die Erhöhung der Sporenkonzentration auf 3,5 Stunden oder weniger verkürzt werden können. Bevor das entwickelte Schnelltestsystem als marktfähiges Produkt angeboten werden kann, müssen im Bereich der Schwellenwerte noch Feineinstellungen vorgenommen werden. Des Weiteren müssen für die in diesem Vorhaben nicht betrachteten, aus der Literatur allerdings bereits bekannten Desinfektionsmittel, Validierungs- und Korrelationsuntersuchungen durchgeführt werden. Neben der in diesem Forschungsvorhaben gewählten Variante mit Teströhrchen zeigten erste Vergleichsuntersuchungen mit Brillantschwarzreduktionstests, dass auch dieses System nach Modifikationen zur Untersuchung von Gülle prinzipiell geeignet ist. Ein wesentlicher Bestandteil des zukünftigen Testsystems stellt eine Vordiffusionsschicht zur Matrixabtrennung dar. Des Weiteren müssen vor der Kommerzialisierung umfangreiche Validierungsuntersuchungen durchgeführt werden. Aus dem Kreis der im Projektbegleitenden Ausschuss vertretenen Firmen wurde bereits Interesse zur Fortführung der Arbeiten bis zur Entwicklung eines marktreifen Systems signalisiert.

## 7 Wirtschaftliche Bedeutung des Forschungsthemas für kleine und mittlere Unternehmen (kmU)

### 7.1 Voraussichtliche Nutzung der Forschungsergebnisse

In dem hier beschriebenen abgeschlossenen Forschungsvorhaben wurde ein aussagekräftiger anaerober Hemmstofftest zur Überprüfung von Gülle entwickelt. Auf der Basis dieses Hemmstofftestes wird kleinen und mittleren Unternehmen, die im Bereich der Entwicklung und Bereitstellung von Schnelltestsystemen für den landwirtschaftlichen Bereich tätig sind, eine neue Produktentwicklung ermöglicht.

Wie aus der Novellierung des EEG ersichtlich wird, soll die verstärkte Nutzung von Gülle als Gärsubstrat voraussichtlich durch die Einführung eines "Gülle-Bonus" gefördert werden. Da der Bau und Betrieb von Biogasanlagen auch weiterhin EU-weit durch Förderinstrumente wie das EEG unterstützt wird, kann auch mit einem weiteren Zuwachs in der Biogasbranche gerechnet werden. Der Einsatz von Abfällen wie Lebens- und Speisemittelreste oder Gülle als Gärsubstrat für Anlagen wird dabei weiterhin von Bedeutung sein, da diese Stoffe kostenfrei (Gülle) oder sogar mit Zuzahlung (Abfälle) erhältlich sind. Bei nachwachsenden Rohstoffen muss hingegen deren Anbau oder deren Einkauf bezahlt werden. Ein Testsystem, mit dem Abfälle oder Gülle in ihrer Eignung als Gärsubstrate eingeschätzt werden können, wird dafür von großem Nutzen sein. Auch für die Betreiber von Biogasanlagen für Gemeinschaftsbetriebe, bei denen die Gärsubstrate von vielen verschiedenen Zulieferern eingebracht werden und stark in Art und Zusammensetzung variieren, ist ein Schnelltestsystem ein ideales Werkzeug, um den störungsfreien Betrieb der Anlage sicher zu stellen.

Langfristig wird hiermit durch den Ausschluss des Vorhandenseins von möglicherweise ökotoxischen Stoffen die Akzeptanz des Gärproduktes als Düngemittel erhöht und damit eine weitere Verbreitung der Biogasanlagentechnik gefördert.

Die erzielten Forschungsergebnisse können gemäß Vordruck [4.1.23] in den Fachgebieten Chemie, Verfahrenstechnik, Lebensmitteltechnik, Bio-, Gentechnik und Umwelttechnik genutzt werden. Eine Nutzung ist ebenfalls im Fachgebiet Mikrobiologie, Hygiene möglich. Entsprechend Vordruck [4.1.24] können die erzielten Forschungsergebnisse hauptsächlich den Wirtschaftszweigen Energie- und Wasserversorgung sowie Erbringung von Dienstleistungen überwiegend für Unternehmen und Chemische Industrie zugeordnet werden. Eine Nutzung ist auch im Ernährungsgewerbe möglich.

## **7.2 Möglicher Beitrag zur Steigerung der Leistungs- und Wettbewerbsfähigkeit der kmU**

Aufgrund der festgeschriebenen Vergütung für die Energieeinspeisung ist die Erhöhung der Substratausbeute und der Betriebsstabilität, die durch die Ergebnisse aus diesem Projekt erreicht werden können, der maßgebliche Faktor, der die Rentabilität dieser Biogasanlagen verbessert. Zurzeit ist kein Schnelltestsystem für die Ermittlung der Hemmstoffbelastung von Gülle auf dem Markt verfügbar. Die Nutzung eines solchen Systems ist aber im Hinblick auf die zunehmende Verwendung von Gülle als Gärsubstrat in Biogasanlagen zu empfehlen. Die Verfügbarkeit des Testaufbaus stellt für kmUs, die in diesem Bereich tätig sind, einen beträchtlichen Wettbewerbsvorsprung gegenüber den größeren Unternehmen dar.

Die hierdurch erzielbare Effizienzsteigerung beim Betrieb von Biogasanlagen wirkt sich mittelbar auch positiv auf die mit der Planung befassten Firmen und Ingenieurbüros aus. Bisher aus Kostengründen gescheiterte Projekte können durch die sich aus diesem Projekt ergebenden Neuentwicklungen auch für kleinere landwirtschaftliche Betriebe ökonomisch effektiver werden. Von dieser Erweiterung des Marktes können die mit Planung und Bau beschäftigten kmU ebenso wie die Hersteller und Vertreiber von Schnelltests direkt profitieren. Weiterhin kann die verbesserte Akzeptanz der Biogasanlagentechnologie zur Verwirklichung neuer Projekte führen, die zuvor nicht umgesetzt wurden.

## **7.3 Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft**

### **7.3.1 Verwertungsplan aus dem Antrag**

Durch die Bereitstellung eines Hemmstofftests zur Identifizierung von relevanten Störkomponenten im Einsatzprodukt werden die Betreiber von Biogasanlagen in die Lage versetzt, Betriebsstörungen zu vermeiden und damit die Effizienz und Wirtschaftlichkeit der Anlagen zu steigern. Parallel dazu wird durch diesen Schnelltest eine bessere Kontrolle der Qualität der eingesetzten Substrate bzw. des Gärproduktes ermöglicht. Dieses kann für die KMU direkt die Absatzfähigkeit dieser Produkte verbessern.

Langfristig wird hiermit auch die Akzeptanz des Gärproduktes als Düngemittel erhöht und damit eine weitere Verbreitung der Biogasanlagentechnik gefördert.

Es bestehen Kontakte zu landwirtschaftlichen Betrieben, Biogasanlagenbetreibern, Anlagenbauern und Verbandsvertretern sowie Herstellern verschiedener Schnelltestsysteme. Durch deren Mitarbeit im projektbegleitenden Ausschuss wird neben der Unterstützung und Bewertung der einzelnen Projektabschnitte auch eine rasche Verbreitung der Ergebnisse in die Praxis gewährleistet. Der Hemmstofftest soll nach der Entwicklung in Zusammenarbeit mit einem Hersteller von Schnelltestsystemen vertrieben und vermarktet werden.

Neben den im Weiteren aufgeführten Wegen zur Verbreitung der Forschungsergebnisse sollen bei der Vermarktung die bereits bestehenden Vertriebsstrukturen und Kontakte des ausgewählten Herstellers genutzt werden.

Die angestrebten Forschungsergebnisse können gemäß Vordruck [4.1.23] in den Fachgebieten Chemie, Verfahrenstechnik und Umwelttechnik genutzt werden. Eine Nutzung ist ebenfalls im Fachgebiet Lebensmitteltechnik, Bio-, Gentechnik möglich. Entsprechend Vordruck [4.1.24] können die angestrebten Forschungsergebnisse hauptsächlich den Wirtschaftszweigen Energie- und Wasserversorgung, Erbringung von Dienstleistungen überwiegend für Unternehmen und Chemische Industrie zugeordnet werden. Eine Nutzung ist auch im Ernährungsgewerbe möglich.

Durch Veröffentlichung in Fachzeitschriften (z. B. Neue Energie, Bioresource Technology, Applied Microbiol. and Biotechnol.) sowie Vorträge auf Fachtagungen (z. B. Jahrestagung Fachverband Biogas, DECHEMA- und VDI-Tagungen) sollen die Ergebnisse dieses Forschungsvorhabens der mittelständischen Industrie, den Beteiligten des Agrarsektors sowie Entscheidungsträgern in Behörden und Institutionen bekannt gemacht werden.

Außerdem organisieren auch die ausführenden Forschungsstellen regelmäßig Informationsveranstaltungen, in deren Rahmen die Projektergebnisse vermittelt werden sollen.

Daneben gehen die Ergebnisse des Projektes an den direkt und indirekt beteiligten Universitäten des Ruhrgebietes und Hannover in das Lehrangebot ein.

### **7.3.2 Projektbegleitende Ergänzungen**

Zu Beginn des Forschungsvorhabens wurden die im Projektbegleitenden Ausschuss vertretenen Firmen- und Verbandsmitglieder über die Problematik „Hemmstoffe in Gülle“ informiert. Insbesondere Anlagenbetreibern wird durch das laufende Forschungsvorhaben die Möglichkeit eingeräumt, bei unbekanntem Störungen der Biogasproduktion mit den Forschungsstellen in Kontakt zu treten und über allgemeine aber insbesondere auch über die in diesem Forschungsvorhaben betrachtete Probleme zu diskutieren und ggf. Proben einzusenden. In der Zwischenzeit haben mehrere Anlagenbetreiber die Möglichkeit genutzt, Proben von Anlagen mit verminderter Biogasausbeute einzusenden. In einem Fall zeigten die Laboranalysen einen eindeutigen Zusammenhang mit dem Einsatz von Desinfektionsmitteln. Die Untersuchungen zu diesem Themenkomplex werden weiter fortgesetzt. Durch die Weiterentwicklung der Hemmstoffanalytik in Gülle wird neben der allgemeinen Verfügbarkeit von Analysenverfahren für Tetracycline und Sulfonamide nun auch der Nachweis von wichtigen Sulfonamid-Metaboliten einem breiten Anwenderkreis ermöglicht. Die Ergebnisse wurden den PA-Mitgliedern im Rahmen der PA-Sitzungen am 02.11.2005, 06.12.2006 und 09.11.2007 mitgeteilt. Durch Teilnahme von Mitgliedern der Forschungsstellen an nationalen Tagungen und Messen (8. Forum Technologie und Innovation: Bioenergie und nachwach-

sende Rohstoffe, 3. Bochumer Energietag, VDI-Seminar: Einsatz von Biomasse in Verbrennungs- und Vergasungsanlagen, Jahrestagung des Fachverbandes Biogas, 58. Fachtagung des Bayrischen Landesamtes für Umwelt (Ifu) „Tierarzneimittel in der Umwelt“, Vortrag bei der Sitzung der AG Umwelt des Milch Industrie Verbandes – MIV, Jahrestagung der GDCh - Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie 2007, Biotechnica 2007) und internationalen Tagungen (SETAC 2006, SETAC 2007, INCOM/Lifecom 2007, HPLC 2007) wurden und werden die in diesem Forschungsvorhaben behandelten Problemstellungen und die erzielten Ergebnisse den o.g. Branchen und Wirtschaftszweigen aktiv publik gemacht. Darüber hinaus sind erste Ergebnisse in der CLB 2006 sowie zu den analytischen Methoden in der Dissertation von Sascha Giegold publiziert worden. Weitere Veröffentlichungen zur Dosis-Wirkungs-Beziehung und dem Verhalten der Antibiotika beim Gärprozess sind derzeit in Vorbereitung.

Neben den direkt beteiligten Hochschulen konnten durch die Durchführung von Praxissemester- und Diplomarbeiten die ersten Erkenntnisse des Forschungsvorhabens auch in das Lehrangebot der Hochschule Niederrhein einfließen.

Für die Weiterentwicklung und den Vertrieb des Hemmstofftests nach Ende des Forschungsvorhabens haben bereits Hersteller von Schnelltestsystemen (KMU) Interesse bekundet.



## 8 Veröffentlichungen

### Zeitschriftenbeiträge

- J. Türk, R. Römling. *Ultraschnelle und hochauflösende Flüssigchromatographie: Grundlagen, Anwendungen, Grenzen*. CLB. 2006, **57**(9/10): 385-388.

### Poster

- I. Strzysch, J. Tuerk, B. Becker, U. Merrettig-Bruns, A. Nickisch-Hartfiel. *Development and comparison of different laboratory fermentation tests for inhibition tests*. SETAC Europe 17<sup>th</sup> Annual Meeting, 20.-24.05.2007, Porto, Portugal.
- J. Tuerk, I. Strzysch, B. Becker, U. Merrettig-Bruns, S. Kabasci, S. Mohring, G. Hamscher. *Effects of selected antibiotics on biogas production and occurrence of residues in fermentation products*. SETAC Europe 17<sup>th</sup> Annual Meeting, 20.-24.05.2007, Porto, Portugal.
- J. Tuerk, I. Strzysch, S. Giegold, T. Teutenberg, B. Becker, U. Merrettig-Bruns, S. Kabasci, S. Mohring, G. Hamscher. *Analysis of sulfonamides in liquid manure and residues in fermentation products by LC-MS/MS, LC-MS<sup>n</sup> and high temperature LC-MS/MS*. HPLC 2007, 31<sup>st</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, 17. – 21.06.2007, Ghent, Belgium.
- I. Strzysch, B. Derricks, S. Giegold, J. Tuerk, T. Teutenberg, B. Becker, U. Merrettig-Bruns, S. Kabasci, S. Mohring, G. Hamscher. *Auswirkungen ausgewählter Antibiotika auf die Biogasproduktion und deren Abbauverhalten während des Fermentationsprozesses*. Jahrestagung der GDCh – Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie, 26.-28. September 2007, Osnabrück.

## Vorträge

- S. Mohring, I. Strzysch, J. Türk, B. Becker, U. Merrettig-Bruns, G. Hamscher G. Untersuchungen zum Abbauverhalten ausgewählter Sulfonamide während der Biogasproduktion mittels LC-MS-MS. 17. Symposium deutschsprachiger Veterinärpharmakologen und -toxikologen, 27.09.-28.09.2007, Berlin.
- J. Türk, I. Strzysch, B. Becker, U. Merrettig-Bruns, S. Kabasci, S. Mohring, G. Hamscher. *Entwicklung eines mikrobiellen Schnelltests zur Identifizierung von Hemmstoffen bei anaeroben Gärprozessen*. AG UMWELT, Milch Industrie Verband, 27.03.2007, Aachen.

## Wissenschaftliche Arbeiten

- Diplomarbeit „Aufbau und Optimierung von Fermentationssystemen und Untersuchung des Einflusses ausgewählter Hemmstoffe auf die anaerobe Biogasbildung“, Ina Strzysch, Hochschule Niederrhein, 2007
- Diplomarbeit „Antibiotika in Gülle – Entwicklung eines Analysenverfahrens“, Carsten van Bonn, Hochschule Niederrhein, 2007
- Diplomarbeit „Konstruktion und Erprobung eines neuartigen mikrobiellen Schnelltests zur Identifizierung von Hemmstoffen bei anaeroben Gärprozessen“, Svenja Hermuth, Ruhr-Universität Bochum, 2008
- Dissertation „Application of high temperature - high performance liquid chromatography (HT-HPLC)“, M.Sc. Sascha Giegold, Universität Siegen, 2008

## 9 Literaturverzeichnis

- [1] H. Schulz, B. Eder. *Biogas Praxis*. 2001: Ökobuchverlag Staufen.
- [2] A. Lallai, G. Mura, N. Onnis. *The effects of certain antibiotics on biogas production in the anaerobic digestion of pig waste slurry*. *Bioresour Technol*, 2002. **82**(2): 205-208.
- [3] D.I. Massé, D. Lu, L. Massé, R.L. Droste. *Effect of antibiotics on psychrophilic anaerobic digestion of swine manure slurry in sequencing batch reactors*. *Bioresour Technol*, 2000. **75**(3): 205-211.
- [4] R. Block (Fa. BIGATEC), D. Hölder (Fa. ENR), A. Krieg (Fa. Krieg & Fischer Ing. GmbH), Dr. S. Raedeker (Fa. AGR Entsorgung GmbH), Dr. C. da Costa Gomez (Fachverband Biogas e. V.), A. Adriany (Fa. AiM), A. Anton (MIV e. V.), weitere nicht namentlich genannte Anlagenbetreiber. *Letters of Intent (LOI) und persönliche Mitteilungen*. 2002-2004.
- [5] A. Wellinger. *Biogas-Handbuch; Grundlagen, Planung, Betrieb landwirtschaftlicher Biogasanlagen*. 2. Auflage. 1991, Aarau: Verlag Wirz
- [6] FNR. *Handreichung Biogasgewinnung und -nutzung*. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., 2006.
- [7] Fachverband Biogas e. V. *Erhebung bei Ministerien und angegliederten Behörden der Länder durch den Fachverband Biogas e. V.* 2007.
- [8] V. Kühnen, H.E. Goldbach. *Schwermetallbilanzen verschiedener Betriebstypen: Eintragswege, Flüsse, Minderungspotential*. Schriftreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL, 2004. **118**: 1-213.
- [9] H. Engels. *Verhalten von ausgewählten Tetrazyklinen und Sulfonamiden in Wirtschaftsdünger und in Böden*. 2004: Dissertation, Universität Göttingen.
- [10] J.P. Langhammer, H. Büning-Pfaue. *Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe als Rückstände in Gülle und im landwirtschaftlichen Umfeld*. 1989: Dissertation, Universität Bonn.
- [11] H. Engels, C. Winckler, H.T. Pawelzick, G. Hamscher. *Occurrence of antibiotics in pig manure: a survey in northwestern Germany*. 14th Annual Meeting of SETAC Europe, 18.-22.04.2004, Prague, Czech Republic, Abstract Book, 2004.
- [12] C. Winckler, A. Grafe. *Verhalten von Tetrazyklinen und anderen Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden*. 2004. UBA-Text Nr. 44: Umweltbundesamt.
- [13] M. Grote. *Antiinfektivaeinträge aus Tierproduktion in terrestrische und aquatische Kompartimente*. Abschlussbericht für MUNLV, Forschungsauftrag II A 5-2038.06.06.01-B/T 2/01, 2005.
- [14] C. Winckler, A. Grafe. *Use of Veterinary Drugs in Intensive Animal Production. Evidence for Persistence of Tetracycline in Pig Slurry*. *JSS – J Soils & Sediments*, 2001. **1**(2): 66 - 70.
- [15] J.H. Kues, H.; Pawelzick, H. T.; Pluquet, E.; Hamscher, G. *Einträge potenzieller Schadstoffe in den Boden über Wirtschaftsdünger. Wirkung auf Bodenorganismen und Verlagerung*. Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen, Referat IV.6 Bodenschutz und Bundesverband Boden (Hrsg.): Bodenschutz - europäisch und lokal: Publikation zur

- gemeinsamen Fachtagung = Soil protection: publication by the joint specialist conference (Umwelt), 2004: 55-62.
- [16] T. Pfeifer, J. Tuerk, K. Bester, M. Spiteller. *Determination of selected sulfonamide antibiotics and trimethoprim in manure by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2002. **16**(7): 663-669.
- [17] M.Y. Haller, S.R. Muller, C.S. McArdell, A.C. Alder, M.J. Suter. *Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2002. **952**(1-2): 111-120.
- [18] W. Eberhard, C. Scheffknecht. *Biogasgülle Nähr- und Schadstoffgehalte in Gärrückständen*. KA Korrespondenz Abwasser, Abfall, 2008. **55**(1): 45-50.
- [19] B. Böhnke, W. Bischofsberger, C.F. Seyfried. *Anaerobtechnik; Handbuch der anaeroben Behandlung von Abwasser und Schlamm*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 1993.
- [20] R. Köhler. *Schadenswirkungen auf den Schlammfaulungsprozeß durch stagnierend und toxisch wirkende Stoffe*. Wasser-Luft und Betrieb, 1966. **6**: 388-395.
- [21] K. Scherber, A. Steiner. *Zur Toxizität von Schwermetallen bei der biologischen Abwassereinigung*. Münchener Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flußbiologie, 1982. **34**: 191-207.
- [22] A. Konzeli-Katsiri, N. Kartsonas. *Inhibition of Anaerobic Digestion by Heavy Metals, Anaerobic Digestion of Sewage Sludge and Organic Agricultural Wastes*. Elivier Applied Science Publishers London, New York, 1986: 104-119.
- [23] V.H. Varel, A.G. Hashimoto. *Methane Production by Fermentor Cultures Acclimated to Waste from Cattle Fed Monensin, Lasalocid, Salinomycin, or Avoparcin*. Appl Environ Microbiol, 1982: 1415-1420.
- [24] R. Böhm. *Auswirkungen von Rückständen von Antiinfektiva in tierischen Ausscheidungen auf die Güllebehandlung und den Böden*. Dtsch Tierärztl Wschr, 1996. **103**(7): 237-284.
- [25] J.L. Sanz, N. Rodriguez, R. Amils. *The action of antibiotics on the anaerobic digestion process*. Appl Microbiol Biotechnol, 1996. **46**(5-6): 587-592.
- [26] D.P. Chynoweth, A.C. Wilkie, J.M. Owens. *Anaerobic Processing of Piggery Wastes: A Review*. Dept. Agric Biol Eng Soil Wat Sci Dept, 1998.
- [27] A. Schänzler, R. Böhm. *Potenzielle Schadorganismen und Stoffe in Futtermitteln sowie in tierischen Fäkalien*. Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), 2000. **4**: 285 - 350.
- [28] H. Hummel. *Untersuchungen zum postantibiotischen Effekt bei Pseudomonas aeruginosa-Isolation einer Intensivstation*. 1999: Dissertation, Humboldt-Universität Berlin.
- [29] S. Schwarz, A. Böttner, et al. *Empfindlichkeitsüberprüfung bakterieller Infektionserreger von Tieren gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen: Methoden zur in-vitro Empfindlichkeitsprüfung und deren Eignung in Hinblick auf die Erarbeitung therapeutisch nutzbarer Ergebnisse*. Berl. Münchner Tierärztl. Wschr., 2003. **116**: 353-361.
- [30] S. Schwarz. *Empfindlichkeitsüberprüfung von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen: Vorschläge zur Belegung der Mikrotiterplatten (Layout) in der Routinediagnostik der DVG-Arbeitsgruppe "Antibiotikaresistenz"*. Deutsches Tierärzteblatt, 2004. **52**(3): 253-254.

- [31] S. Priebe. *Untersuchungen zur in-vitro Empfindlichkeit boviner und porciner Erreger von Infektionen des Respirationstraktes gegenüber Florfenicol*. in *Dissertation*. 2003.
- [32] A. Rocksinn. *Untersuchungen zur Implementierung des Bouillon-Mikrodilutionsverfahrens zur Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen*. in *Dissertation*. 2005.
- [33] A. Krey. *Molekularbiologische Resistenzentwicklung bei S. aureus*. in *Dissertation*. 2004.
- [34] I. Stock, K. Machka, A. Rodloff, B. Wiedemann. *Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle in der Antibiotika-Empfindlichkeitsbestimmung von Bakterien mit der Mikrodilution*. *Chemotherapie Journal*, 2001. **10**(3): 78-98.
- [35] S. Sczesny. *Analytik von Tetracyclinen in Umwelt und Lebensmittelproben mittels selektiver Extraktionsverfahren und sensitivem Nachweis durch HPLC gekoppelt mit mikrobiologischen Assay und Tandem-Massenspektrometrie*. 2001: *Dissertation*, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- [36] A. Bendix. *Entwicklung einer Methode zum Nachweis von Rückständen ausgewählter Antibiotika und Chemotherapeutika in Hühnereiern mittels mikrobiologischem Hemmstofftest*. 2003: *Dissertation*, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- [37] G. Hamscher, H.T. Pawelzick, H. Hoper, H. Nau. *Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure*. *Environ Toxicol Chem*, 2005. **24**(4): 861-868.
- [38] T. Pfeifer, J. Tuerk, R. Fuchs. *Structural characterization of sulfadiazine metabolites using H/D exchange combined with various MS/MS experiments*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005. **16**(10): 1687-1694.
- [39] T. Teutenberg, H.J. Goetze, J. Tuerk, J. Ploeger, T.K. Kiffmeyer, K.G. Schmidt, W.G. Kohorst, T. Rohe, H.D. Jansen, H. Weber. *Development and application of a specially designed heating system for temperature-programmed high-performance liquid chromatography using subcritical water as the mobile phase*. *J Chromatogr A*, 2006. **1114**(1): 89-96.
- [40] G. Hamscher, S. Sczesny, H. Hoper, H. Nau. *Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *Anal Chem*, 2002. **74**(7): 1509-1518.
- [41] G. Hamscher, et al. *Stoffe mit pharmakologischer Wirkung einschließlich hormonell aktiver Substanzen in der Umwelt: Nachweis von Tetracyclinen in güllegedüngten Böden*. *Dtsch Tierarztl Wschr*, 2000. **107**: 332-334.
- [42] E. Martinez-Carballo, C. Gonzalez-Barreiro, A. Sitka, N. Kreuzinger, S. Scharf, O. Gans. *Determination of selected quaternary ammonium compounds by liquid chromatography with mass spectrometry. Part II. Application to sediment and sludge samples in Austria*. *Environ Pollut*, 2007. **146**(2): 543-547.
- [43] E. Martinez-Carballo, A. Sitka, C. Gonzalez-Barreiro, N. Kreuzinger, M. Furhacker, S. Scharf, O. Gans. *Determination of selected quaternary ammonium compounds by liquid chromatography with mass spectrometry. Part I. Application to surface, waste and indirect discharge water samples in Austria*. *Environ Pollut*, 2007. **145**(2): 489-496.
- [44] K. Bester. *Triclosan in a sewage treatment process - balances and monitoring data*. *Water Res*, 2003. **37**: 3891-3896.

- [45] DIN 38414 - Teil 2. *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Teil 2 Schlamm und Sedimente (Gruppe S): Bestimmung des Wassergehaltes und des Trockenrückstandes (S2)*. 1985.
- [46] J. Wiegel, S.-U. Kuk, G.W. Kohring. *Clostridium thermobutyricum sp. nov., a Moderate Thermophile Isolated from a Cellulolytic Culture, That Produces Butyrate as the Major Product*. Int J Syst Bacteriol, 1989. **39**: 199ff.
- [47] L. Häggström, N. Molin. *Calcium alginate immobilized cells of Clostridium acetobutylicum for solvent production*. Biotechnol Letters, 1980. **2**(5): 241-246.
- [48] R. Süßmuth, J. Eberspächer, R. Haag, W. Springer. *Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum*. 1987: Georg Thieme Verlag Stuttgart New York.
- [49] DIN 38414 - Teil 8. *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser- Abwasser- und Schlammuntersuchung - Teil 8 Schlamm und Sedimente (Gruppe S): Bestimmung des Faulverhaltens (S8)*. 1985.
- [50] B. Halling-Sørensen, G. Sengeløv, J. Tjørnelund. *Toxicity of Tetracyclines and Tetracycline Degradation Products to Environmentally Relevant Bacteria, Including Selected Tetracycline-Resistant Bacteria*. Arch Environ Contam Toxicol, 2002. **42**: 263-271.
- [51] J.F.M. Nouws, T.B. Vree, Y.A. Hekster. *In vitro antimicrobial activity of hydroxy and N4-acetyl sulphonamide metabolites*. Vet Quat, 1985. **7**(1).
- [52] M. Lamshoft, P. Sukul, S. Zuhlke, M. Spiteller. *Metabolism of 14C-labelled and non-labelled sulfadiazine after administration to pigs*. Anal Bioanal Chem, 2007. **388**(8): 1733-1745.
- [53] E. Alexander. *Methodenentwicklung zur Bestimmung von  $\beta$ -Lactam Antibiotika in Gülle mittels LC-MS/MS*. 2004: Diplomarbeit, Universität Duisburg - Essen.
- [54] M.P. Schlüsener, M.A. von Arb, K. Bester. *Elimination of macrolides, tiamulin, and salinomycin during manure storage*. Arch Environ Contam Toxicol, 2006. **51**(1): 21-28.
- [55] M.J. Suter, A.C. Alder, M. Berg, C.S. McArdell, S. Riediker, W. Giger. *Determination of hydrophilic and amphiphilic organic pollutants in the aquatic environment*. Chimia, 1997. **51**: 871-877.