



Antibiotikarückstände in Gülle und Böden

Marc Lamshöft (M.Lamshoeft@infu.uni-dortmund.de), Sebastian Zühlke (Zuehlke@infu.uni-dortmund.de), Premasis Sukul (P.Sukul@infu.uni-dortmund.de), Souvik Kusari (Souvik.Kusari@infu.uni-dortmund.de), Michael Spitteller (spitteller@infu.uni-dortmund.de)

Zusammenfassung

Im Gegensatz zu Humanarzneimitteln können Tierarzneimittel und ihre Metabolite über die Ausbringung der Gülle in terrestrische Umweltsysteme gelangen. Die Metabolite der untersuchten Tierarzneimittel Difloxacin und Sulfadiazin verfügen über eine antimikrobielle Restaktivität und es ist daher notwendig, einen metabolischen „pathway“ für Boden und Wasser zu erstellen. Vielfach werden die Rückstände bei der Güllelagerung nicht oder nur unzureichend abgebaut und tragen zu einer Kontamination landwirtschaftlicher Flächen bei. Dort bilden sie nicht-extrahierbare Rückstände, welche neben dem extrahierbaren Anteil zur Exposition der Bodenfauna und -flora beitragen.

Einleitung

Rückstände von Antibiotika können nach Applikation an Tieren mit der Gülle auf landwirtschaftlich genutzte Böden gelangen. Neben Tetracyclinen werden u.a. Sulfonamide, Fluorchinolone, β -Lactame und Makrolide eingesetzt [1], die sich unter Umständen in Böden anreichern und bei ausreichender Mobilität bis ins Grundwasser verlagert werden [2-3]. Nicht nur die Wirkstoffe selbst, sondern auch ihre möglicherweise aktiven Metabolite werden von den behandelten Tieren ausgeschieden, in Boden und Wasser weiter metabolisiert und können, zusammen mit möglichen Resistenzgenen, über den Wirtschaftsdünger Gülle in die Umwelt gelangen [4-7]. Die hier vorgestellten Studien beschäftigen sich mit Difloxacin, einem Antibiotikum aus der Klasse der Fluorchinolone, und dem bakteriostatisch wirksamen Sulfonamid Sulfadiazin. Mittels ^{14}C -markierter Wirkstoffe wurde die Ausscheidungskinetik bei Schweinen bestimmt sowie die Stabilität bei der Güllelagerung und der Verbleib im Boden.

Analytische Methoden

Die Bilanzierung der Radioaktivität der eingesetzten ^{14}C -markierten Verbindung erfolgte mittels Veraschung der Böden und Messung des freigesetzten $^{14}\text{CO}_2$, Flüssigszintillationsmessung aller Extrakte und Bestimmung des durch Mineralisierung gebildeten $^{14}\text{CO}_2$. Die Identifizierung der Metaboliten erfolgte mit LC-HRMSn (LTQ-Orbitrap) und die Quantifizierung erfolgte über LC-MS/MS (TSQ Quantum Ultra AM-Triplequadropol). Die Gülle und Bodenproben wurden

entsprechend existierender Vorschriften für die Fluorchinolone oder Sulfonamide extrahiert und zunächst mittels HPLC-Radiodetektion-MS im Fullscan-Modus untersucht. Zur Identifizierung von mengenmäßig relevanten „unbekannten“ Metaboliten werden Quasimolekülionen mit den Signalen des Radiodetektors abgeglichen. Hochauflösende massenspektrometrische Detektoren ermöglichten für die aufgespürten Verbindungen das Aufzeichnen der Produktionenspektren mit für die Verbindungsklassen charakteristischen Strukturelementen. Diese Produktionenspektren lieferten für viele Verbindungen genügend Strukturinformationen zur Identifizierung der Metabolite.

Verstoffwechslung im Tier – Ausscheidungskinetik

Difloxacin wurde über einen Zeitraum von 5 Tagen Mastschweinen verabreicht. Im Anschluss wurden Tagesproben der Exkremente (Urin und Fäzes) für die Dauer von 10 Tagen gesammelt und die Ausscheidungskinetik bestimmt. Wirkstoff und Metabolite wurden zu mehr als 92% über den Urin ausgeschieden. Die Ausscheidungskinetik für Difloxacin und Sarafloxacin ist in Abbildung 1 gegeben. Die größten Mengen wurden an den Tagen 4 bis 6 nach Applikation ausgeschieden.

Die erstmals eingesetzten ^{14}C -markierten Wirkstoffe erlaubten eine vollständige Bilanzierung des Abbau- und Metabolisierungspfadens in der Gülle und der Sequestration im Boden sowie die mögliche Bildung von $^{14}\text{CO}_2$.

Neben der Ausgangsverbindung wurde als Hauptmetabolit eine demethylierte Verbindung detektiert, welche durch hochauflösende Massenspektrometrie und mit zertifiziertem Standard als Sarafloxacin (Handelsprodukt mit Schwerpunkt der Anwendung bei Geflügel und Fischzucht) bestimmt wurde. Zudem wurden drei weitere Metabolite in Spuren identifiziert, welche durch den Abbau bzw. durch Oxidation des Piperazinringes entstanden sind (Abb. 2).

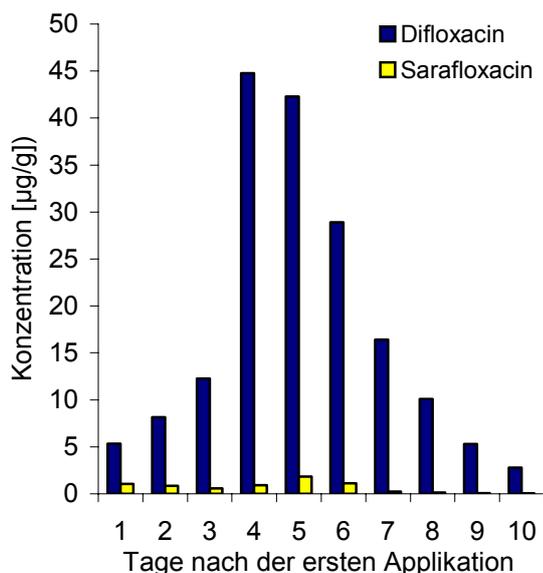


Abb. 1: Ausscheidungskinetik von Difloxacin und seines Hauptmetaboliten Sarafloxacin nach Applikation an Mast Schweinen; Konzentration in den Tagesmischproben; nach [6]

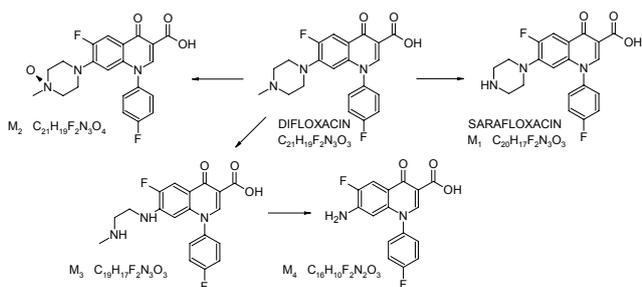


Abb. 2: (→ [Grafik vergrößern](#)) Ausgeschiedene Biotransformationsprodukte von Difloxacin nach Applikation an Mast Schweinen; nach [6]

Mikrobielle Aktivität in Gülle

Difloxacin verfügt über ein breites Wirkspektrum gegen Grampositive und -negative Bakterien [8-10]. Auch der Hauptmetabolit Sarafloxacin besitzt hohe antibakterielle Aktivität [11]. Die Untersuchung der mikrobiellen Aktivität der Tagesmischgülle liefert für ausgewählte Bakterienstämme (DSM 799 *Staphylococcus aureus subsp. Aureus*, DSM 681 *Klebsiella pneumoniae subsp. Ozaenae*, DSM 682 *Escherichia coli*) eine Hemmung des Wachstums (Abb. 3). Dabei korreliert die antibakterielle Aktivität direkt mit dem Logarithmus der Konzentration von Difloxacin und Sarafloxacin ($r^2 > 0,85$) [6].

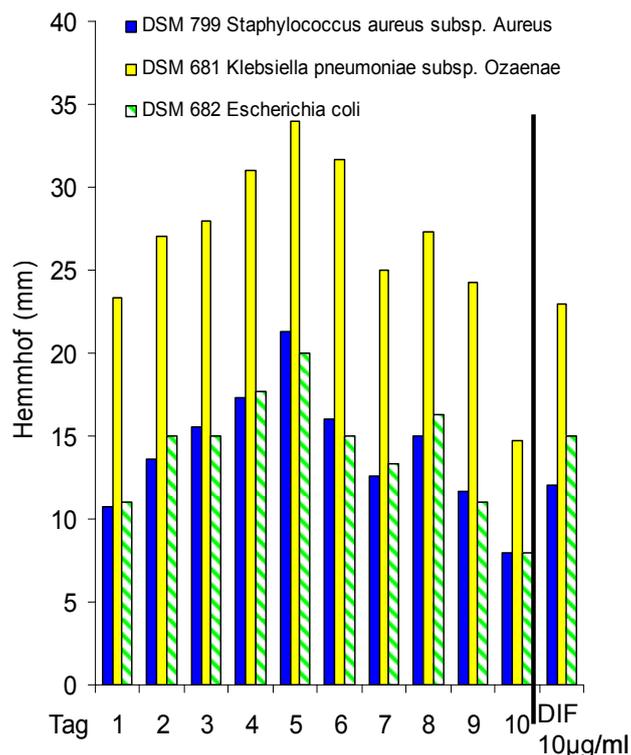


Abb. 3: Residuale mikrobielle Aktivität der Tagesmischgülle nach Applikation von Difloxacin an Mast Schweinen und Standard Difloxacin (10µg/ml); nach [6]

Extrahierbarkeit aus Gülle und Böden

Wichtig für die Beurteilung von Tierarzneimitteln in der Umwelt ist die Ermittlung der Extrahierbarkeit der Wirkstoffe und Metaboliten aus der Gülle und aus dem Boden/Gülle-Gemisch. Diese lässt sich idealerweise über die ^{14}C -Bilanzierung bestimmen. Die angewandte einfache Extraktionsmethode für Gülle lieferte für Difloxacin Wiederfindungen von nahezu 100% [6], wenn mit einem Gemisch aus Acetonitril/Wasser ausgeschüttelt wird.

Untersuchungen zur Extrahierbarkeit von Difloxacin and Sarafloxacin aus Böden mit verschiedenen Lösungsmitteln und Methoden zeigten dagegen deutliche Unterschiede. So enthielten die $CaCl_2$ -Extrakte (vielfach als bioverfügbare Fraktion bezeichnet) bzw. Methanolextrakte (potentiell bioverfügbare Fraktion) auch nach nur kurzer Alterung des Bodens mit der Gülle (31 Tage) maximal 0,1% der applizierten Radioaktivität. Nur mit verbesserten Extraktionsmethoden wie der ASE (Accelerated Solvent Extraction) unter alkalischen Bedingungen (pH 9) konnte eine wesentlich höhere Wiederfindung beobachtet werden (siehe Abb. 4), wovon mittels Massenspektrometrie mehr als die Hälfte als Difloxacin und Sarafloxacin identifiziert wurden. Der extrahierbare Anteil verringerte sich im Laufe der Bodeninkubation zu Gunsten der gebundenen Rückstände, die in der Regel als nicht bioverfügbar bezeichnet werden, während die Mineralisierung mit unter 1% vernachlässigbar ist.

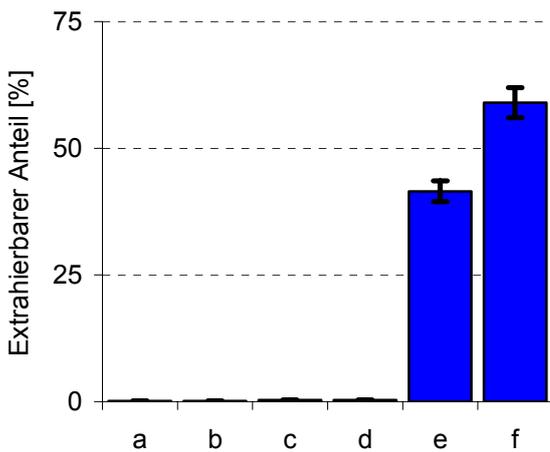


Abb. 4: Extrahierbare Radioaktivität im Boden nach Ausbringen von ¹⁴C- Difloxacin-haltiger Gülle, a) Überkopfschüttler mit CaCl₂; b) Überkopfschüttler mit Methanol; c) Überkopfschüttler mit Aceton +0.1% HCl; d) Soxhlet mit Methanol 0.1% Ameisensäure; e) ASE mit 50% Acetonitril, 50% Wasser +50mM Phosphorsäure; f) ASE mit 63% Ethylacetat, 25% Methanol, 9% Wasser, 3%NH₃

Die Bedeutung nicht extrahierbarer Rückstände für das Langzeitverhalten von Chemikalien in Böden ist bis heute nicht hinreichend bekannt. Wie Versuche von Jablonowski et al. [12] zeigten, konnten selbst 22 Jahren nach Applikation von ¹⁴C-markiertem Atrazin noch geringe Mengen des Wirkstoffes gemessen werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit aus dem Pool der „bond residues“ freigesetzt wurden und somit noch zur Grundwasserkontamination beitragen.

Untersuchungen mit Sulfadiazin und seinen Metaboliten zeigten eine sehr gute Extrahierbarkeit aus der Gülle und die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen im Boden [13-14]. Der gebundene Anteil ist hier allerdings kleiner als bei Difloxacin/Sarafloxacin. Zarfl et al. [15] entwickelten auf Basis dieser Daten für Sulfadiazin und seiner Metabolite ein konzeptionelles Modell, welches den Verbleib der Verbindungen in Böden beschreibt.

Lagerstabilität in Gülle

Bevor Gülle auf landwirtschaftliche Flächen ausgebracht wird, wird diese in der Regel einige Monate gelagert. Zur Klärung möglicher Umwandlungs- und Abbaureaktionen wurde belastete Gülle bei verschiedenen Temperaturen (10°C, 20°C) und in verschiedenen Konzentrationen (durch Verdünnen mit unbelasteter, frischer Gülle) unter Sauerstoff sowie bei Sauerstoffausschluss gelagert, beprobt und untersucht.

Bei allen durchgeführten Lagerungsversuchen mit Difloxacin konnten selbst nach fünfmonatiger Lagerung noch mehr als 80% der aktiven Wirkstoffe/Metabolite festgestellt werden (Abb. 5). Ähnliche Ergebnisse erhielten wir bei Lagerversuchen mit Sulfadiazin und seinen Metabolite; hier beobachteten wir die Rückumwandlung des Acetyl-Metaboliten zum ursprünglichen Wirkstoff und damit eine Wirkungsverstärkung der Rückstände [16].

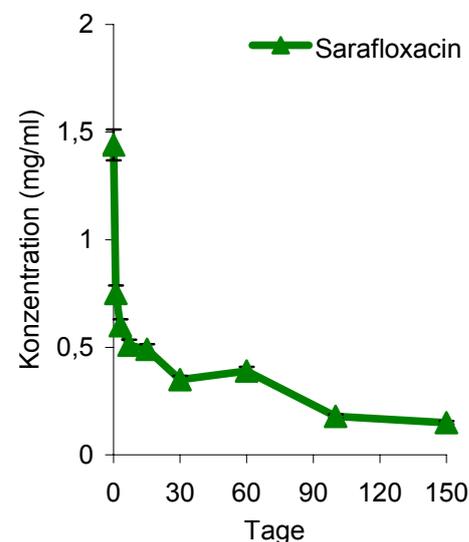
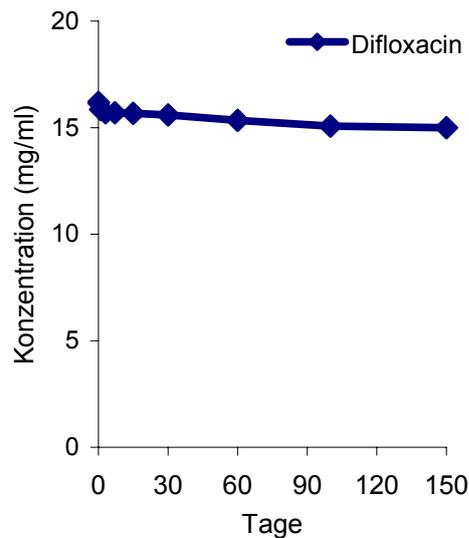


Abb. 5: Lagerstabilität von Difloxacin und seines Hauptmetaboliten Sarafloxacin in belasteter Gülle bei 10°C; nach [14]

Verbleib nach Ausbringen auf Böden

Belastete Gülle wurde in Labor- und in Freilandversuchen auf Böden ausgebracht und eingearbeitet. Die Analyseergebnisse zeigten, dass Rückstände der aktiven Verbindungen über lange Zeiträume in der Umwelt verweilen, auch wenn das Bindungsverhalten am Boden bisher nicht hinreichend geklärt werden konnte. Rückstände des applizierten Difloxacins lassen sich zweifelsfrei in Bodenextrakten in geringen Konzentrationen auch noch nach 180 Tagen detektieren. In gemeinsamen Studien unseres Instituts mit der Gruppe von Prof. W. Amelung (INRES, Uni Bonn) konnte ein ähnliches Verhalten für Sulfadiazin und seiner Metabolite im Boden beobachtet werden [13].

Die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Smalla (JKI, Braunschweig) konnte einen Zusammenhang zwischen Antibiotikum in Gülle und güllebehandelten Boden und der Bildung von

spezifischen Resistenzgenen zeigen. [7]. Bei der Güllelagerung wurde ein exponentieller Anstieg der enthaltenen Resistenzgene beobachtet. Das Ausbringen von sulfadiazinbelasteter Gülle bringt somit große Mengen dieser Gene auf die landwirtschaftlichen Flächen.

Derzeit beschäftigen wir uns mit der Frage, ob Rückstände von Tierarzneimitteln und ihrer Metabolite nach Ausbringung von Gülle auf Böden durch Pflanzen aufgenommen werden.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei der DFG für die finanzielle Unterstützung im Rahmen der Forschergruppe 566 „Tierarzneimittel in Böden : Grundlagen für eine Risikoanalyse (<http://www.for566.boden.uni-bonn.de/>) (SP 255/12-3) und für die gute Zusammenarbeit mit Frau Prof. K. Smalla (Julius Kühn Institut, Braunschweig) und Prof. W Amelung (INRES, Universität Bonn).

Literatur

- [1] GERMAP 2008, BVL, Oktober 2008.
- [2] Boxall, A.B.A., Fogg, L.A., Blackwell, P.A., Kay, P., Pemberton, E.J., Croxford, A., 2004, Veterinary medicines in the environment. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 180, 1–91.
- [3] Sukul, P., Spiteller, M. 2006, Sulfonamides in the environment as veterinary drugs. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 187, 67-101.
- [4] Lamshöft, M., Sukul, P., Zühlke, S., Spiteller, M. 2007, Metabolism of ¹⁴C-labelled and non labelled Sulfadiazine after administration to pigs. Anal. Bioanal. Chem. 388, 1733-1745.
- [5] Kemper, N. 2008, Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. Ecol. Indicators 8, 1-13.
- [6] Sukul, P., Lamshöft, M., Kusari, S., Zühlke, S., Spiteller, M. 2009, Metabolism and excretion kinetics of ¹⁴C-labeled and non-labeled difloxacin in pigs after oral administration, and antimicrobial activity of manure containing difloxacin and its metabolites. Environm. Res. 109, 225-231.
- [7] Heuer, H., Focks, A., Lamshöft, K., Smalla, M., Matthies, M., Spiteller, M. 2008, Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. Soil Biol. Biochem. 40, 1892-1900.
- [8] Eliopoulos, G.M., Moellering, A.E., Reiszner, E., Moellering, R.C. (Jr.) 1985, In vitro activities of the quinolone antimicrobials agents A-56619 and A-56620. Antimicrob. Agents Chemother. 28, 514-520.
- [9] Stamm, J.M., Hanson, C.W., Chu, D.T.W., Bailer, R., Vojtko, C., Fernandes, P.B. 1986, In vitro evaluation of A-56619 (difloxacin) and A-56620: new aryl-fluoroquinolones. Antimicrob. Agents Chemother. 29, 193-200.
- [10] Walker, R.D. 2000, Fluoroquinolones. In: Prescott, J.F., Baggot, J.D., Walker, R.D. (Eds.) Antimicrobial Therapy

in Veterinary Medicine. 3rd ed. Iowa State University Press, Ames, IA., S. 315-338.

- [11] Kusari, S., Deivasigamani, P., Lamshöft, M., Spiteller, M. 2009, In vitro residual Anti-bacterial activity of difloxacin, sarafloxacin and their photoproducts after photolysis in water. Environm. Pollut. 157, 2722-2730.
- [12] Jablonowski, N., Koeppchen, S., Hofmann, D., Schaeffer, A., Burauel, P. 2009, Persistence of ¹⁴C-labeled atrazine and its residues in field lysimeter soil after 22 years. Environm. Pollut. 157, 2126-2131.
- [13] Förster, M., Laabs, V., Lamshöft, M., Groeneweg, J., Zühlke, S., Spiteller, M., Krauss, M., Kaupenjohann, M., Amelung, W. 2009, Sequestration of manure-applied sulfadiazine residues in soils. Environ. Sci. Technol. 43(6), 1824-1830.
- [14] Förster, M., Laabs, V., Lamshöft, M., Pütz, T., Amelung, W. 2008, Analysis of aged sulfadiazine residues in soils using microwave extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem. 391, 1029-1038.
- [15] Zarfl, C., Klasmeier, J., Matthies, M. 2009, A conceptual model describing the fate of sulfadiazine and its metabolites observed in manure-amended soils. Chemosphere 77, 720-726.
- [16] Lamshöft, M., Sukul, P., Zühlke, S., Spiteller, M. 2010, Behavior of ¹⁴C-sulfadiazine and ¹⁴C-difloxacin during manure storage. Sci. Tot. Environ. 408, 1563-1568.

Korrespondenzadresse

Marc Lamshöft
Technische Universität Dortmund
Institut für Umweltforschung (INFU)
Otto-Hahn-Str. 6
44221 Dortmund