

Aus dem Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
(Geschäftsführender Direktor: Herr Prof. Dr. R. Jahn)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
(Dekan: Herr Prof. Dr. P. Wycisk)

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**„Untersuchungen zum Einfluss von Arsen auf die mikrobielle Fermentation im
Pansen und die Akkumulation in verschiedenen Geweben des Schafes“**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Trophologie (Dr. troph.)

vorgelegt von

Diplom-Trophologin Ricarda Krüger
geb. am 10.07.1981 in Blankenburg

Gutachter: Prof. Dr. habil. Rodehutschord
Prof. Dr. habil. Schenkel
Prof. Dr. habil. Stangl

Tag der Verteidigung: 26.04.2010

Halle/Saale 2010

Diese Arbeit wurde dankenswerterweise durch ein
Promotionsstipendium der H. Wilhelm Schaumann Stiftung
ermöglicht.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen	V
Verzeichnis der Tabellen	VI
Verzeichnis der Anhangsabbildungen	IX
Verzeichnis der Anhangstabellen	X
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
2 Arsen in der Umwelt – Geologische, toxikologische und physiologische Aspekte	3
2.1 Verbreitung und Vorkommen	3
2.2 Toxizität und Metabolismus	5
2.3 Arsen in Pflanzen und Mikroorganismen	9
2.4 Wirkung von Arsen auf molekularer Ebene	12
3 Untersuchungsansätze und Zielstellung	14
4 Überblick zum Versuchsaufbau	18
5 <i>In vitro</i>-Studien: Material und Methoden	20
5.1 Spendertiere	20
5.2 Einsatz arsenhaltiger Erde	21
5.2.1 Gasbildung	21
5.2.1.1 Varianten	21
5.2.1.2 Vorbereitung der Kolbenprober	22
5.2.1.3 Inkubationsmedium	22
5.2.1.4 Durchführung	23
5.2.1.5 Mathematisch-statistische Auswertung	24
5.2.2 Verdaulichkeitsversuch	26
5.2.2.1 Versuchsration	27
5.2.2.2 Versuchsaufbau	27
5.2.2.3 Berechnung der Rohnährstoffverdaulichkeit und der Umsetzbaren Energie	28
5.2.2.4 Arsenausscheidung	29
5.2.2.5 Statistische Auswertung	29
5.3 Einsatz synthetischer Arsenverbindungen	29
5.3.1 Arsenverbindungen	29
5.3.2 Verwendete Futtermittel	30
5.3.3 Gasbildung	30

5.3.3.1	Varianten	30
5.3.4	Pansensimulation	31
5.3.4.1	Varianten	31
5.3.4.2	Markereinsatz (¹⁵ N)	32
5.3.4.3	Aufbau des Systems	32
5.3.4.4	Durchführung	33
5.3.4.5	Gewinnung der Referenzmikroben	35
5.3.4.6	Berechnung des Abbaus der Rohnährstoffe	35
5.3.4.7	Berechnung der Effizienz	36
5.3.4.8	Statistische Auswertung	36
5.4	Analysen	36
5.4.1	Weender Rohnährstoffe	36
5.4.2	Detergenzienfaser	37
5.4.3	¹⁴ N, ¹⁵ N und Gesamt-N	37
5.4.4	Aminosäuren	37
5.4.5	Arsen	38
6	<i>In vitro</i>-Studien: Ergebnisse	39
6.1	Einsatz arsenhaltiger Erde	39
6.1.1	Gasbildung	39
6.1.2	Verdaulichkeitsversuch	40
6.1.2.1	Verdaulichkeit der Rohnährstoffe	40
6.1.2.2	Arsenausscheidung	42
6.2	Einsatz synthetischer Arsenverbindungen	43
6.2.1	Gasbildung	43
6.2.2	Pansensimulation	45
6.2.2.1	Abbau der Rohnährstoffe	45
6.2.2.2	Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese	46
6.2.2.3	Verbleib von Arsen	46
6.2.2.4	Aminosäuremuster	48
7	<i>In vitro</i>-Studien: Diskussion	49
7.1	Gasbildung	49
7.1.1	Zulage arsenhaltiger Erde	49
7.1.2	Zulage von Arsentrioxid und Na-Arsenat	52
7.1.3	Überlegungen zur Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Wiederkäuer	56
7.2	Verdaulichkeitsversuch	56
7.3	Pansensimulation	57

8	<i>In vivo</i>-Studien: Material und Methoden	60
8.1	Arsenkontamination des Futters	60
8.2	Verdaulichkeitsversuch	60
8.2.1	Versuchsaufbau	60
8.2.2	Versuchsration	61
8.2.3	Arsenabreicherung	61
8.3	Verbleib von Arsen in tragenden Mutterschafen und in Lämmern	62
8.3.1	Versuchstiere und Haltung	62
8.3.2	Versuchsration Mutterschafe	62
8.3.3	Versuchsration Lämmer	64
8.3.4	Probennahme	64
8.3.5	Aufbereitung von Horn, Wolle und Plazenta	66
8.4	Probenaufbereitung und Analysen	66
8.4.1	Weender Roh Nährstoffe	66
8.4.2	Detergenzienfaser	67
8.4.3	Blutbild	67
8.4.3.1	Statistische Auswertung	67
8.4.4	Probenaufschluss	68
8.4.5	Arsenanalyse	69
8.4.6	Spezifische Enzymaktivitäten	71
8.4.6.1	Verwendete Chemikalien und Substrate	71
8.4.6.2	Aufbereitung der Gewebe	71
8.4.6.3	Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40)	72
8.4.6.4	Hexokinase (EC 2.7.1.1)/Glukokinase (EC 2.7.1.2)	73
8.4.6.5	Berechnung der spezifischen Enzymaktivitäten	74
8.4.6.6	Proteinbestimmung	75
8.4.6.7	Statistische Auswertung	75
8.4.7	Proteingehalt in der Frischmasse	76
8.4.7.1	Statistische Auswertung	77
9	<i>In vivo</i>-Studien: Ergebnisse	78
9.1	Verdaulichkeitsversuch	78
9.1.1	Verdaulichkeit der Roh Nährstoffe	78
9.1.2	Arsenausscheidung	78
9.1.3	Arsenabreicherung	79
9.2	Verbleib von Arsen in Mutterschafen und Lämmern	80
9.2.1	Leistungsdaten	80

9.2.2	Blutparameter	81
9.2.3	Arsenkonzentrationen	83
9.2.3.1	Arsenkonzentrationen – Mutterschafe	84
9.2.3.2	Arsenkonzentrationen – Lämmer	88
9.3	Spezifische Enzymaktivitäten	91
9.3.1	Pyruvatkinase	91
9.3.2	Hexokinase/Glukokinase	95
9.4	Proteingehalt in der Frischmasse	99
10	<i>In vivo</i>-Studien: Diskussion	100
10.1	Verdaulichkeitsversuch	100
10.2	Verbleib von Arsen in Mutterschafen und Lämmern	102
10.3	Spezifische Enzymaktivitäten	116
11	Schlussfolgerung und Bewertung der Ergebnisse	122
12	Zusammenfassung	130
Summary		133
Literaturverzeichnis		136
Anhang		159

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Metabolismus des Arsens im Menschen (in Anlehnung an MÜCKTER, 2002) 8

Abbildung 2: Übersicht zur Versuchsplanung 8

Abbildung 3: Graphische Darstellung der modifizierten Gompertz-Funktion (BEUVINK & KOGUT, 1993) und deren 1. und 2. Ableitung zur Schätzung der maximalen Gasbildung und des Wendepunktes 25

Abbildung 4: Aufbau des Rusitec-Systems (nach JASPER, 2000) 33

Abbildung 5: Kumulative Gasbildung über 93 h bei der Fermentation einer Grassilage mit unterschiedlichen Konzentratanteilen (0, 20 und 30 %) und einer Zulage von Erde mit geringem (-) oder hohem (+) Arsengehalt 39

Abbildung 6: Kumulative Gasbildung über 93 h bei der Fermentation einer Grassilage mit Zusatz von Arsen trioxid oder Na-Arsenat in verschiedenen Konzentrationsstufen (n=8) 44

Abbildung 7: Schema der enzymatischen Reaktion zur Bestimmung der Pyruvatkinaseaktivität 72

Abbildung 8: Schema der enzymatischen Reaktion zur Bestimmung der Hexokinase- bzw. Glukokinaseaktivität 73

Abbildung 9: Arsenkonzentration (c_{As}) in Kotproben von Hammeln, beprobt in einem Zeitraum von 282 h nach Absatz (Zeitpunkt „0“) von arsenhaltigem Futter 79

Abbildung 10: Arsenkonzentration in fettfreier Wolle und Horn der Mutterschafe mit Arsensupplementierung 85

Abbildung 11: An- bzw. Abreicherung von Arsen in der Wolle von Lämmern nach der Umstellung auf das Konzentrat der jeweils anderen Variante („cross-over“-Behandlung) am Beispiel von Einzeltieren 90

Abbildung 12: An- bzw. Abreicherung von Arsen im Horn von Lämmern nach der Umstellung auf das Konzentrat der jeweils anderen Variante („cross-over“-Behandlung) am Beispiel von Einzeltieren 90

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Arsengehalte der Umgebungsluft unterschiedlich stark belasteter Gebiete (MARQUARDT & SCHÄFER, 1997)	4
Tabelle 2: Ausgewählte anorganische und organische Arsenverbindungen und deren mittlere letale Dosis (LD ₅₀) in mg Arsenverbindung/kg Körpergewicht (bei oraler Gabe an Mäuse; nach einer Zusammenfassung verschiedener Studien von DONOHUE & ABERNATHY, 1999)	6
Tabelle 3: Konzentratgehalt und Arsenkonzentration in den Versuchsvarianten mit arsenhaltiger (+) oder arsenarmer (-) Erde	22
Tabelle 4: Angestrebter und analysierter Arsengehalt (mg As/kg T) in der Grassilage nach Zusatz von Arsentrioxid (As ^{III}) und Na-Arsenat (As ^V)	31
Tabelle 5: Geschätztes Gasbildungspotenzial (<i>b</i>), maximale Gasbildungsrate (Gb _{max}) und Zeitpunkt des Erreichens (t _{wendepunkt}) bei der Inkubation einer Grassilage mit unterschiedlichen Konzentratanteilen (0, 20 und 30 % der T) und dem Zusatz von Erde mit einem geringen (-) oder hohen (+) Arsengehalt	40
Tabelle 6: Verdaulichkeit der Rohnährstoffe und abgeleitete Energiekonzentrationen in einer Grassilage, in Grünfutter und in einem Heu ohne („Kontrolle“) oder mit („Erde“) Zusatz einer arsenhaltigen Erde (Mittelwert und Standardabweichung; n=4)	41
Tabelle 7: Arsenaufnahme und -ausscheidung bei der Vorlage von Grassilage, Grünfutter oder Heu ohne („Kontrolle“) oder mit („Erde“) Zusatz einer arsenhaltigen Erde (Mittelwert und Standardabweichung; n=4)	43
Tabelle 8: Geschätztes Gasbildungspotenzial (<i>b</i>), maximale Gasbildungsrate (Gb _{max}) und Zeitpunkt des Erreichens (t _{wendepunkt}) bei der Inkubation einer Grassilage mit Zusatz von Arsentrioxid oder Na-Arsenat (in mg As/kg T) in verschiedenen Konzentrationsstufen (n = 8)	45
Tabelle 9: Abbau der Rohnährstoffe und Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese bei der Inkubation einer Grassilage mit dem Zusatz von Arsentrioxid oder Na-Arsenat in jeweils zwei Konzentrationsstufen (Mittelwert und Standardabweichung; n=3)	46
Tabelle 10: Wiederfindung von Arsen im Pansensimulationssystem bei der Inkubation einer Grassilage mit Zusatz von Arsentrioxid oder Na-Arsenat in jeweils zwei Konzentrationsstufen (Mittelwert und Standardabweichung; n=3)	47
Tabelle 11: Einfluss von E _h und pH-Wert auf das Löslichkeits- (↑↓) und Reduktionsverhalten (↑↓) von Arsen in Bodensuspensionen (modifiziert nach MASSCHELEYN <i>et al.</i> , 1991)	50
Tabelle 12: Zusammensetzung der täglichen Gesamtration (g Originalsubstanz) der Mutterschafe und Arsenaufnahme der Mutterschafe der Arsengruppe in den verschiedenen Stadien der Trächtigkeit	63

Tabelle 13: Beprobungsfrequenz für verschiedene Matrices bei Mutterschafen (M) und Lämmern (L) 65

Tabelle 14: Einwaagen des Probenmaterials für den mikrowellengestützten Aufschluss und eingestelltes Endvolumen 68

Tabelle 15: Verdaulichkeit der Rohnährstoffe, der Faserfraktionen und der stickstofffreien Extraktstoffe einer Ration ohne („Kontrolle“) oder mit („Arsen“) Arsentrioxid im Konzentratfutter im Versuch mit Hammeln (%; Mittelwert und Standardabweichung) 78

Tabelle 16: Arsenaufnahme und –ausscheidung bei der Verabreichung einer Ration ohne („Kontrolle“) oder mit („Arsen“) Arsentrioxid im Konzentratfutter im Versuch mit Hammeln (mg As/d; Mittelwert und Standardabweichung; n=4) 79

Tabelle 17: Mittlere Lebendmassen (kg) der Mutterschafe im Versuchszeitraum (Mittelwert und Standardabweichung) 80

Tabelle 18: Erythrocyten-, Leukocyten-, Hämoglobingehalt und Hämatokrit bei Mutterschafen im Versuchszeitraum (Mittelwert und Standardabweichung) 82

Tabelle 19: Mittlere Arsenkonzentration im Blutserum der Mutterschafe beider Versuchsgruppen ($\mu\text{g As/l}$; Mittelwert und Standardabweichung) 84

Tabelle 20: Arsengehalte in Muskel, Niere und Leber von Mutterschafen zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns, der Ablammung und 8 Wochen nach der Ablammung (mg As/kg T; Einzeltierdaten) 86

Tabelle 21: Arsenkonzentration in den Plazenten der Mutterschafe (mg As/kg T; Einzeltierdaten) 87

Tabelle 22: Mittlere Arsenkonzentration im Kolostrum und in der reifen Milch der Mutterschafe beider Versuchsvarianten ($\mu\text{g As/l}$; Mittelwert und Standardabweichung) 87

Tabelle 23: Mittlere Arsenkonzentration im Serum der Lämmer in verschiedenen Lebensabschnitten ($\mu\text{g As/l}$; Mittelwert und Standardabweichung) 88

Tabelle 24: Pyruvatkinaseaktivität in der Leber von Mutterschafen der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3) 91

Tabelle 25: Pyruvatkinaseaktivität in der Leber von Lämmern der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3) 92

Tabelle 26: Pyruvatkinaseaktivität in der Niere von Mutterschafen der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3) 93

Tabelle 27: Pyruvatkinaseaktivität in der Niere von Lämmern der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3) 93

Tabelle 28: Pyruvatkinaseaktivität im Muskel von Mutterschafen der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (U/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3) 94

Tabelle 29: Pyruvatkinaseaktivität im Muskel von Lämmern der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (U/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3) 95

Tabelle 30: Glukokinaseaktivität in der Leber von Mutterschafen der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3) 96

Tabelle 31: Glukokinaseaktivität in der Leber von Lämmern der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3) 96

Tabelle 32: Hexokinaseaktivität in der Niere von Mutterschafen der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3) 97

Tabelle 33: Hexokinaseaktivität in der Niere von Lämmern der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3) 97

Tabelle 34: Hexokinaseaktivität im Muskel von Mutterschafen der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3) 98

Tabelle 35: Hexokinaseaktivität im Muskel von Lämmern der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3) 99

Tabelle 36: Mittlere tägliche Arsenaufnahme von Lämmern bei unterschiedlicher Höhe und Art der Arsenzulage, sowie Konzentrationen in Leber, Niere und Muskel bei BUCY *et al.* (1954) im Vergleich zur eigenen Untersuchung mit Lämmern (n=3 je Variante) 111

Tabelle 37: Mittlere tägliche Arsenaufnahme von Lämmern und Mutterschafen bei unterschiedlicher Höhe und Art der Arsenzulage, sowie Konzentrationen in Leber, Niere und Muskel bei BUCY *et al.* (1955) im Vergleich zur eigenen Untersuchung (n=3 je Variante) 112

Tabelle 38: Tolerable Dosen für die chronische orale Aufnahme von Arsen (modifiziert nach SCHUMACHER-WOLZ *et al.*, 2007) 126

Verzeichnis der Anhangsabbildungen

Abbildung A1: Verdünnungsreihe des Homogenates zur Überprüfung der Proportionalität zwischen Enzymmenge und gemessener Enzymaktivität der Pyruvatkinase-katalysierten Reaktion in den Geweben 159

Abbildung A2: Verdünnungsreihe des Homogenates zur Überprüfung der Proportionalität zwischen Enzymmenge und gemessener Enzymaktivität in der Glukokinase- und Hexokinase-katalysierten Reaktion in den Geweben 159

Abbildung A3: Herstellung und Zusammensetzung des Bradford-Reagenzes (BRADFORD, 1976, modifiziert nach KLEBER *et al.*, 1988) 159

Abbildung A4: Aminosäuresequenz der Hexokinase III in der Ratte; Cystein wurde grau hinterlegt (nach SCHWAB & WILSON, 1991) 160

Abbildung A5: Aminosäurefrequenz der Pyruvatkinase in der Rattenleber; Cystein wurde grau hinterlegt (nach MUIRHEAD *et al.*, 1986) 161

Verzeichnis der Anhangstabellen

Tabelle A1: Zusammensetzung, Inhaltsstoff- und Zusatzstoffgehalte des Konzentratfutters „Schäferstolz“ – Ergänzungsfuttermittel für Zuchtschafe 162

Tabelle A2: Inhaltsstoff- und Zusatzstoffgehalte des BASU-Mineralfutters für Schafe, Rezept-Nr. 9501 162

Tabelle A3: Zusammensetzung der Lösungen für das Inkubationsmedium im Versuch zur Gasbildungsdynamik 162

Tabelle A4: Kalkulierte und analysierte Arsengehalte, Trockenmasse, Roh Nährstoff- und Energiegehalt der Rationen im Verdaulichkeitsversuch ohne (-) und mit (+) Zusatz von arsenhaltiger Erde 163

Tabelle A5: Höhe der Dosierung von anorganischen Arsenverbindungen zur Kontamination von 20 g Grassilage (94,2 % T) für den HFT 163

Tabelle A6: Höhe der Dosierung von anorganischen Arsenverbindungen zur Kontamination von 15 g Grassilage (91,2 % T) für die Pansensimulation 164

Tabelle A7: Zusammensetzung der Pufferlösung in der Pansensimulation (in Anlehnung an MCDUGALL, 1948) 164

Tabelle A8: Trockenmasse, Roh Nährstoffe und Menge an Futterresten und Hammelkot bei Vorlage der Grassilage ohne („Kontrolle“) oder mit („Erde“) Zusatz von arsenhaltiger Erde (Einzeltierdaten) 164

Tabelle A9: Trockenmasse, Roh Nährstoffe und Menge an Futterresten und Hammelkot bei Vorlage des Grünfutters ohne („Kontrolle“) oder mit („Erde“) Zusatz von arsenhaltiger Erde (Einzeltierdaten) 165

Tabelle A10: Trockenmasse, Roh Nährstoffe und Menge an Futterresten und Hammelkot bei Vorlage von Heu ohne („Kontrolle“) oder mit („Erde“) Zusatz von arsenhaltiger Erde (Einzeltierdaten) 165

Tabelle A11: Arsen im Futter, in den Futterresten, im Harn und im Kot, sowie die mittlere tägliche Exkretion und die ausgeschiedene Arsenmenge im Verdaulichkeitsversuch mit 3 Grasprodukten ohne („Kontrolle“) und mit („Erde“) Zusatz von arsenhaltiger Erde 166

Tabelle A12: Arsen in der Grassilage (As-Input), in den Überläufen und Futterresten (As-Output) in der Pansensimulation bei der Inkubation der Grassilage mit zugesetztem Arsentrioxid (As^{III}) oder Na-Arsenat (As^V) in jeweils zwei Konzentrationsstufen (n=3) 167

Tabelle A13: Aminosäurekonzentrationen des mikrobiellen Proteins im Pansensimulationsversuch beim Zusatz von Arsentrioxid (As^{III}) oder Na-Arsenat (As^V) zu einer Grassilage in jeweils zwei Konzentrationsstufen (Mittelwert und Standardabweichung; n=3) 167

Tabelle A14: Trockenmasse, Rohrnährstoffgehalte und Faserfraktionen in der Gesamtration im Verdaulichkeitsversuch168

Tabelle A15: Mittlerer Rohrnährstoffgehalt und Umsetzbare Energie in der Gesamtration, sowie Menge an täglich aufgenommener Trockenmasse in den (Trächtigkeits-)Stadien der Mutterschafe der Kontroll- (K) und Arsengruppe (As) 168

Tabelle A16: Kalkulierte und tatsächliche Konzentratfutteraufnahme sowie Gesamtarsenaufnahme der Lämmer von der 5. bis zur 8. Lebenswoche (Einzeltierdaten) 169

Tabelle A17: Variabilität der Messwerte bei der Bestimmung von Arsenkonzentrationen in einer hergestellten Konzentrationsreihe (n=10)169

Tabelle A18: Vergleich der gemessenen Arsenkonzentrationen einer arsenkontaminierten Grassilage mittels ICP-OES und ICP-MS 170

Tabelle A19: Trockenmasse, Rohrnährstoffe, Detergenzienfaser, N-freie Extraktstoffe und Menge der Futterreste und des Hammelkotes im Verdaulichkeitsversuch mit Zusatz von Arsentrioxid im Konzentratfutter 170

Tabelle A20: Arsenkonzentration im Harn und im Kot, deren mittlere tägliche Exkretion und ausgeschiedene Arsenmenge im Verdaulichkeitsversuch mit Zusatz von Arsentrioxid im Konzentratfutter 171

Tabelle A21: Arsenkonzentration im Kot der Hammel im Laufe des Versuches zur Abreicherung von Arsen aus dem Körper (Einzeltierdaten) 171

Tabelle A22: Arsenkonzentration im Serum, im Kolostrum („Ablammung“) und in der reifen Milch der Mutterschafe ($\mu\text{g As/l}$; Einzeltierdaten) 173

Tabelle A23: Arsenkonzentration in der fettfreien Wolle und im Horn von Mutterschafen und Lämmern (mg As/kg T ; Einzeltierdaten) 174

Tabelle A24: Arsenkonzentration im Serum der Lämmer ($\mu\text{g As/l}$; Einzeltierdaten) und Zeitpunkt der Schlachtung 175

Tabelle A25: Arsenkonzentration in Niere, Leber und Muskel der Lämmer zu den Beprobungszeitpunkten (mg As/kg T ; Einzeltierdaten)176

Tabelle A26: P-Werte aus dem statistischen Vergleich der Pyruvatkinaseaktivität in der Leber, in der Niere und im Muskel der 8 Wochen alten Lämmern ohne („Kontrolle“) und mit („Arsen“) Aufnahme von arsenhaltigem Konzentratfutter (n=3) 177

Tabelle A27: P-Werte aus dem statistischen Vergleich der Glukokinaseaktivität in der Leber und der Hexokinaseaktivität in der Niere und im Muskel der 8 Wochen alten Lämmern ohne („Kontrolle“) und mit („Arsen“) Aufnahme von arsenhaltigem Konzentratfutter (n=3) 178

Tabelle A28: Pyruvatkinaseaktivität in der Leber der Mutterschafe und Lämmer der Kontroll- und Arsengruppe zu den verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein ; Einzeltierdaten)179

Tabelle A29: Pyruvatkinaseaktivität in der Niere der Mutterschafe und Lämmer der Kontroll- und Arsengruppe zu den verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Einzeltierdaten) 180

Tabelle A30: Pyruvatkinaseaktivität im Muskel der Mutterschafe und Lämmer der Kontroll- und Arsengruppe zu den verschiedenen Beprobungszeitpunkten (U/mg Protein; Einzeltierdaten) 181

Tabelle A31: Glukokinaseaktivität in der Leber der Mutterschafe und Lämmer der Kontroll- und Arsengruppe zu den verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Einzeltierdaten) 182

Tabelle A32: Hexokinaseaktivität in der Niere der Mutterschafe und Lämmer der Kontroll- und Arsengruppe zu den verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Einzeltierdaten) 183

Tabelle A33: Hexokinaseaktivität im Muskel der Mutterschafe und Lämmer der Kontroll- und Arsengruppe zu den verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Einzeltierdaten) 184

Tabelle A34: Proteingehalt in der Leber von Mutterschafen und Lämmern der Kontroll- und Arsengruppe zu den verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mg Protein/g FM; Mittelwert und Standardabweichung; n=3) 185

Tabelle A35: Proteingehalt in der Niere von Mutterschafen und Lämmern der Kontroll- und Arsengruppe zu den verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mg Protein/g FM; Mittelwert und Standardabweichung; n=3) 186

Tabelle A36: Proteingehalt im Muskel von Mutterschafen und Lämmern der Kontroll- und Arsengruppe zu den verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mg Protein/g FM; Mittelwert und Standardabweichung; n=3) 187

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AQP	Aquaglyceroporin
As	Arsen
As ³⁺	3-wertiges Arsen
As ⁵⁺	5-wertiges Arsen
AS ^{III}	arsenige Säure
AS ^V	Arsensäure
ADF	saure Detergenzienfaser
ADI	Acceptable Daily Intake (siehe auch RfD)
ADP	Adenosindiphosphat
AfBN	Ausschuss für Bedarfsnormen
ATP	Adenosintriphosphat
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
<i>b</i>	Gasbildungspotenzial
BBodSchG	Bundesbodenschutzgesetz
BBodSchV	Bundesbodenschutz- und Altlastenverordnung
BGA	Bundesgesundheitsamt
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
<i>d</i>	Tag
dest.	destilliert
DMA ^V	Dimethylarsinsäure
DXF	verdauliche Rohfaser
DXL	verdauliches Rohfett
DOS	verdauliche organische Substanz
DVGW	Deutsche Vereinigung des Gas- und Wasserfaches e.V.
EC	enzyme classification
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E _h	Redoxpotenzial
ΔE	Extinktionsänderung
ε	Extinktionskoeffizient
Fa.	Firma

FM	Frischmasse
FutMV	Futtermittelverordnung
Gb	Gasbildung
Gb _{max}	maximale Gasbildung
G/l	Giga/l = 10 ⁹ /l
<i>glm</i>	allgemeines lineares Modell
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HFT	Hohenheimer Futterwerttest
ICP-MS	Massenspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma
ICP-OES	optisches Emissionspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
k. A.	keine Angabe
KG	Körpergewicht
LD ₅₀	mittlere letale Dosis (= Menge eines verabreichten Stoffes, die bei 50 % der Versuchstiere zum Tod führte)
LfL	Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft
LfUG	Sächsisches Landesamt für Umwelt und Geologie
l/l	Liter/l = Volumenanteil der Zellen am Blutvolumen
LM	Lebendmasse
LMBG	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level (= niedrigste Dosis eines verabreichten chemischen Stoffes, bei der im Tierversuch noch schädigende Wirkungen auftraten)
ME	Umsetzbare Energie
MMA ^{III}	Monomethylarsonige Säure
MMA ^V	Monomethylarsonsäure
MRL	Minimal Risk Level (= duldbare Körperdosis eines Stoffes, die bei einer Aufnahme über einen bestimmten Zeitraum noch keine gesundheitlichen Schäden hervorruft)
MW	Mittelwert
Na-Arsenat	Dinatriumhydrogenarsenat Heptahydrat
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid

NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
n	Anzahl
NDF	neutrale Detergenzienfaser
NfE	stickstofffreie Extraktstoffe
n.n.	nicht nachweisbar
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level (= höchste Dosis eines Stoffes, die auch bei andauernder Aufnahme keine erkennbaren und messbaren Wirkungen hinterlässt)
OS	organische Substanz
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplex
PEP	Phosphoenolpyruvat
PMTDI	Provisional Maximum Tolerable Daily Intake
p.p.	post partum
PTWI	Provisional Tolerable Weekly Intake
RfD	Reference Dose (= toxikologisch akzeptable Dosis; ergibt sich aus der Verrechnung des NOAEL mit einem Sicherheitsfaktor, meist 10^{-2} , um empfindliche Personen oder z.B. extreme Abweichungen vom durchschnittlichen Verzehr zu berücksichtigen; entspricht dem ADI = Acceptable Daily Intake)
Rusitec	rumen simulation technique = Pansensimulationssystem
s	Standardabweichung
SCAN	Scientific Committee on Animal Nutrition
T	Trockenmasse
Tab.	Tabelle
T/l	Tera/l = 10^{12} /l
TMAO	Trimethylarsinoxid
TRD	Tolerierbare Resorbierte Dosis (= maximal tolerable Körperdosis, wobei der resorbierte Anteil der Schadstoffmenge an der zugeführten Menge berücksichtigt wird)
TrinkwV	Trinkwasserverordnung
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UBA	Umweltbundesamt
UFZ	Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung
U.S. EPA	U.S. Environmental Protection Agency

VDLUFA	Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten
WHO	World Health Organization
XA	Rohasche
XF	Rohfaser
XL	Rohfett
XP	Rohprotein

Aminosäuren:

Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Cys	Cystein
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
His	Histidin
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Met	Methionin
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
Ser	Serin
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

1 Einleitung

In verschiedenen Regionen des Freistaates Sachsen weisen die Böden hohe Arsenkonzentrationen auf. Dies ist zum einen geogen bedingt, zum anderen liegt die Ursache in früheren anthropogenen Einwirkungen (LfUG, 2003). Eine große Bedeutung kommt dabei den ehemaligen Bergbauaktivitäten zu (Erzgebirge, Voigtland), wodurch arsenhaltige Immissionen, sowie arsenhaltiges Abraummaterial in die Umwelt gelangten. Verwitterungsprozesse und Auswaschungen führten im Laufe der Zeit zur Lösung von Arsen und zur Verteilung von arsenhaltigem Material auf den Flächen. Durch den Eintrag in Fließgewässer wurden weiträumig Arsenkontaminationen bis in die Einzugsgebiete der Mulde und Elbe hervorgerufen (UFZ, 2003). In den vergangenen Jahren führten Überflutungen zur Ablagerung arsenhaltiger Schlämme auf den Grünflächen und bedingen dadurch erhöhte Arsenkonzentrationen im Boden. Dabei wurde in vielen Fällen der bestehende Maßnahmewert von 50 mg Arsen (As)/kg Boden für die Nutzung als Grünland (BBSchV; 2004) überschritten. Bei dem Verzehr von Grünfutter oder dessen Konservaten besteht vorrangig durch anhaftende Bodenpartikel die Gefahr einer Arsenaufnahme für Wiederkäuer. Häufig wird der Grenzwert für Arsen von 2 mg As/kg Futter (FutMV, 2002) bei einer Trockenmasse (T) von 88 % überschritten.

In vielen bisher durchgeführten *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen wurden negative Effekte dieses hochtoxischen Elementes nachgewiesen. Grundsätzlich interagiert 3-wertiges Arsen mit Sulfhydrylgruppen von Proteinen und unterbricht somit eine Reihe von metabolischen Prozessen (ATSDR, 2000). 5-wertiges Arsen kann in diversen biochemischen Reaktionen Phosphat substituieren und damit beispielsweise zur Hydrolyse energiereicher Phosphate führen. In der Literatur wurden vielfach Beeinträchtigungen in der Aktivität von Mikroben (FORSBERG, 1978; SIERRA-ALVAREZ *et al.*, 2004; VÁRADYOVÁ *et al.*, 2006) und Störungen enzymatischer Prozesse (REIN *et al.*, 1979; SHEABAR & YANNAL, 1989; PAL & CHATTERJEE, 2005) beschrieben. Durch die Aufnahme hoher Arsenmengen wurden bei Schafen Gewebeschäden und weitere Vergiftungserscheinungen induziert, teilweise auch mit tödlichem Ausgang (BUCY *et al.*, 1955). Andere Autoren stellten eine Akkumulation von Arsen in Geweben von Wiederkäuern fest bei der Zufuhr von arsenhaltigem Futter (FELDMANN *et al.*, 2000; BERESFORD *et al.*, 2001; RAAB *et al.*, 2002; NANDI *et al.*, 2005). In den genannten Untersuchungen zur Wirkung von Arsen auf die Aktivität von Mikroben wurde fast ausschließlich mit *in vitro*-Verfahren gearbeitet, wobei sehr hohe Arsenkonzentrationen eingesetzt wurden. Gleiches trifft für die

Überprüfung einer Beeinflussung von Enzymaktivitäten durch Arsen zu. In den durchgeführten *in vivo*-Studien wurden entweder sehr hohe Konzentrationen an Arsen im Futter eingesetzt oder die aufgenommenen Arsenverbindungen waren nicht vergleichbar mit denen, wie sie in den sächsischen Böden kontaminierter Regionen vorkommen.

In dieser Arbeit sollte mit Schafen ebenfalls ein Einfluss von Arsen auf die mikrobielle Fermentation von Rohnährstoffen im Pansen überprüft werden. Neben der Anwendung von *in vitro*-Verfahren wurden auch Verdaulichkeitsversuche mit Schafen durchgeführt. Zusätzlich wurde die Ausscheidung von Arsen über Harn und Kot untersucht. In einem weiteren *in vivo*-Versuch mit tragenden Mutterschafen wurde die Akkumulation von Arsen sowohl in tierischen Geweben, als auch im Serum und in der Milch ermittelt. Zusätzlich wurde die transplazentare Übertragung in das ungeborene Lamm überprüft. Versuchsbegleitend wurden hämatologische Parameter untersucht und Enzymaktivitäten gemessen. Anhand der Ergebnisse zur Akkumulation von Arsen sollte zusätzlich eine Abschätzung des Eintrags von Arsen in die Nahrungskette des Menschen vorgenommen werden. Um Parallelen zur Arsenbelastung in der Umwelt ziehen zu können, erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Supplementierung des Arsens im Futter weitestgehend in Anlehnung an die Höhe der natürlichen Arsenkonzentration der Futterpflanzen in den kontaminierten Regionen.

2 Arsen in der Umwelt – Geologische, toxikologische und physiologische Aspekte

2.1 Verbreitung und Vorkommen

Die Gesamtmenge des ubiquitär vorkommenden Halbmetalls Arsen wird auf $4,01 \cdot 10^{16}$ kg geschätzt (MATSCHULLAT, 2000). In Böden wird anorganisches Arsen – vor allem in der 5-wertigen Form (BOWELL, 1994) – einerseits in Metallerzen (z.B. in Verbindung mit Au, Ag, Cu, Fe) fest gebunden (JONES, 2007). Andererseits liegt es unter reduzierenden Bedingungen überwiegend in der 3-wertigen Form vor und geht so bevorzugt Verbindungen mit Schwefel ein (z.B. Arsenopyrit, Auripigment, Realgar) (MOORE *et al.*, 1988; HERING & KNEEBONE, 2002). Die Löslichkeit von Arsen im Boden ist abhängig vom pH-Wert und Redoxpotenzial (E_h) des Bodens und wird zusätzlich durch das Vorkommen von Fe, Mn, Ca, Mg und Al, natürlicher organischer Masse und Tonmineralien als arsenadsorbierende Komponenten beeinflusst (BISSSEN & FRIMMEL, 2003). Veränderungen im pH-Wert oder E_h des Bodens führen zum Zerfall von Arsenverbindungen, wodurch Arsen freigesetzt wird (MASSCHELEYN *et al.*, 1991). Beispielsweise ist das Grundwasser in weiten Gebieten Süd-Ost-Asiens teilweise stark mit Arsen belastet (MUKHERJEE & BHATTACHARYA, 2001; SMEDLEY, 2003). Hauptgrund dessen ist eine reduktive Lösung arsenadsorbierender Eisenoxidhydroxide in der wasserführenden Sedimentschicht, hervorgerufen durch den mikrobiellen Abbau organischer Substanz und einem damit verbundenen Verbrauch von Sauerstoff (NICKSON *et al.*, 2005). Die Arsenaufnahme durch Nutzung des kontaminierten Brunnenwassers in Bangladesh gilt als bisher größte Massenvergiftung einer Landesbevölkerung (SMITH *et al.*, 2000).

Neben natürlichen Prozessen wie Vulkanaktivität und Verwitterung können auch anthropogene Einträge Arsenkontaminationen von Böden, Gewässern und der Atmosphäre hervorrufen (BENNETT, 1981). Der vorwiegend in der Vergangenheit praktizierte Einsatz arsenhaltiger Herbizide, Pestizide und Düngemittel ist auch heute noch ein Grund hoher Arsenbelastungen von Böden in vielen Gebieten der Erde (MAHIMAIRAJA *et al.*, 2005). Die Hauptquelle des anthropogenen Eintrags von Arsen in die Umwelt liegt jedoch in der industriellen Aktivität (JUILLOT *et al.*, 1999). Arsenhaltige Verbindungen, vor allem Diarsentrioxid, werden bei der Herstellung von Holzschutzmitteln, Kupfer- und Bleilegierungen, in der Baumwollindustrie, in Glasmanufakturen und der Halbleiterindustrie verwendet, teils mit zunehmender und teils mit abnehmender Tendenz

(ISHIGURO, 1992). Auch durch die Verbrennung fossiler Brennstoffe gelangte Arsen über Jahrzehnte in großen Mengen in die Atmosphäre und wurde im Laufe der Zeit in hohen Konzentrationen im Boden akkumuliert (KEEGAN *et al.*, 2006). Der Ausstoß arsenhaltiger Abgase ist zwar vorrangig Ursache lokal erhöhter Arsenkonzentrationen im Boden, die Verbreitung von Schadstoffen über den Luftweg führt jedoch auch über die betreffenden Regionen hinaus zu Kontaminationen (KABATA-PENDIAS & PENDIAS, 2000). In Tabelle 1 sind Arsengehalte unterschiedlich stark belasteter Umgebungsluft gegenübergestellt.

Tabelle 1: Arsengehalte der Umgebungsluft unterschiedlich stark belasteter Gebiete (MARQUARDT & SCHÄFER, 1997)

Umgebung	Durchschnittlicher Arsengehalt in der Luft (ng As/m ³)
unbelastet	≤ 1
städtisches Gebiet	1 bis 20
stark urbanisiertes Gebiet mit intensiver Kohleverbrennung	70 bis 500
Nähe zu Kupfer- oder Bleihütten	500 bis 5000

Ein weiterer Grund der Arsenbelastung von Böden und Gewässern besteht in der Gewinnung und Verhüttung von Erzen (BHATTACHARYA *et al.*, 2007). Diese Problematik wurde von SMEDLEY & KINNIBURGH (2002) umfassend dargestellt. Belastungen des Grundwassers bis zu 10 mg As/l konnten in Bergbauregionen nachgewiesen werden. In einer weiteren Untersuchung überstiegen Arsenkonzentrationen in Böden nahe Blei- und Goldschmelzen den normalen Wertebereich (1 bis 40 mg As/kg; WOOLSON, 1977) um mehr als das 100fache (HUTCHINSON *et al.*, 1982; SADLER *et al.*, 1994).

Auch in Deutschland ist eine Arsenbelastung von Böden einiger Regionen durch frühere Bergbauaktivitäten bekannt (SCHWARTZ, 1999; FRIESE *et al.*, 2000). In Sachsen erlangte dieses Problem mit dem Elbehochwasser im Jahr 2002 erneut an Aktualität. Unterspülungen und Überflutungen von Abraumhalden des lange Zeit betriebenen Erzbergbaus führten zur Freisetzung und Verteilung von Arsen. In Verbindung mit den als weitere Schadstoffquelle fungierenden industriellen Altlasten der Chemieregion Bitterfeld-Wolfen führte dies zu weitreichenden Kontaminationen von Böden, Gewässern und Sedimenten der Elbe- und Mulde (GELLER *et al.*, 2004). In diesen Regionen ist daher eine Arsenaufnahme durch Pflanzen als tierische und menschliche Nahrungsquelle

naheliegend. Eine Untersuchung der Arsenaufnahme durch verschiedene Nutzpflanzen (*Zea mays*, *Lolium perenne*, *Brassica napus* und *Helianthus annuus*) zeigte ein hohes Akkumulationspotential der Wurzel gegenüber Arsen (GULZ *et al.*, 2005). Nur geringe Anteile an Arsen wurden im Stängel, in den Blättern und in den Früchten nachgewiesen. Tatsächlich scheinen an den Pflanzen anhaftende Bodenpartikel die primäre Ursache erhöhter Arsengehalte in Grünlandaufwüchsen zu sein, wie HÄBLER & KLOSE (2006) in einer Untersuchung feststellten. Der Grenzwert von 2 mg As/kg Futter (88 % T) nach der Futtermittelverordnung (2002) wurde hier in den Futterpflanzen selbst in weniger als 20 % der untersuchten Proben überschritten. Laut Bundesbodenschutz- und Altlastenverordnung (BBodSchV, 2004) ist eine Nutzung des Bodens als Grünland nur dann erlaubt, wenn der Maßnahmewert von 50 mg As/kg Boden nicht überschritten wird. Andernfalls besteht laut Bundesbodenschutzgesetz (BBodSchG, 2004) zu über 50 % die Wahrscheinlichkeit einer Arsenbelastung des Futtermittels oberhalb des Grenzwertes. Auf 25 % (47.000 ha) der Böden der sächsischen Grünlandflächen überschreitet der Arsengehalt den festgelegten Maßnahmewert teilweise stark. Mit Bodenpartikeln kontaminiertes Pflanzenmaterial stellt bei dessen Aufnahme – vorrangig durch Wiederkäuer – hier die eigentliche Gefahr eines Arsentransfers in das Tier dar. Die Aufnahme von Erde durch weidende Tiere kann über 10 % der gesamten Trockensubstanz (bei Schafen bis zu 30 %; ABRAHAMS & STEIGMAJER, 2003) betragen (SCAN, 2003). Laut einer Untersuchung von THORNTON & ABRAHAMS (1983) können in kontaminierten Regionen 34 bis 90 % der gesamten Arsenzufuhr aus der Aufnahme von Bodenpartikeln resultieren.

2.2 Toxizität und Metabolismus

Die Toxizität von Arsen hängt maßgeblich von dessen Bindungsform und Wertigkeit ab. Organischen Arsenverbindungen wird bereits seit langem ein geringes Toxizitätspotential zugeschrieben (CHAPMAN, 1926), während anorganische Arsenverbindungen allgemein als äußerst toxisch gelten (VAHTER, 1994). Dabei treten abhängig von der Wertigkeit des Arsens weitere Unterschiede in der Toxizität anorganischer Arsenverbindungen auf. Verbindungen, in denen Arsen in der 3-wertigen Form (As^{3+}) vorliegt sind in isomolarer Dosis um den Faktor 2 bis 4 toxischer als Verbindungen, in denen Arsen 5-wertig (As^{5+}) ist (SCHUHMACHER-WOLZ *et al.*, 2007). Diarsentrioxid ist das Anhydrid der arsenigen Säure (As^{III}), wobei Arsen in der 3-wertigen Form vorliegt. Bei der Lösung im wässrigen Milieu entstehen Arsenitionen. Die Metallsalze der As^{III} werden Arsenite genannt (z.B.

Natriumarsenit). Bei der Lösung von Diarsenpentaoxid entsteht Arsensäure (AS^V), deren Metallsalze als Arsenate bezeichnet werden (z.B. Calciumarsenat). Hierbei liegt Arsen in der 5-wertigen Form vor. HINDMARSH (2000) stellte folgende Reihe mit sinkendem Toxizitätspotenzial auf: Arsingas > Arsenite > Arsenate > organische Arsenverbindungen > elementares Arsen. Tabelle 2 gibt einen Überblick über ausgewählte anorganische und organische Arsenverbindungen und deren Toxizität. Beispielsweise wird eine einmalige Aufnahme von 1,43 mg Diarsentrioxid/kg Körpergewicht für den Menschen als mittlere letale Dosis (LD_{50}) angesehen (GOLDFRANK *et al.*, 2006).

Tabelle 2: Ausgewählte anorganische und organische Arsenverbindungen und deren mittlere letale Dosis (LD_{50}) in mg Arsenverbindung/kg Körpergewicht (bei oraler Gabe an Mäuse; nach einer Zusammenfassung verschiedener Studien von DONOHUE & ABERNATHY, 1999)

Anorganische Arsenverbindungen		LD_{50}
Natriumarsenit	$NaAsO_2$	15 – 42
Diarsentrioxid	As_2O_3	34
Arsentrisulfid	As_2S_3	k. A.
Calciumarsenat	$Ca_3As_2O_8$	20 – 800
Diarsenpentaoxid	As_2O_5	k. A.
Organische Arsenverbindungen		
Monomethylarsensäure	$CH_3AsO(OH)_2$	700 – 1800
Dimethylarsinsäure	$(CH_3)_2AsO(OH)$	1200 – 2699
Arsenocholin	$(CH_3)_3AsCH_2CH_2OH$	6500
Arsenobetain	$(CH_3)_3AsCH_2COOH$	≥ 10.000

k. A. – keine Angabe

In marinen Systemen kommt Arsen in vielfältigen organischen Verbindungen vor. Im Wasser gelöstes, anorganisches Dinatriumarsenat und Natriumarsenit kann von Algen aufgenommen (KUROIWA *et al.*, 1994) und methyliert werden (MAEDA *et al.*, 1992). Anschließend erfolgt dann eine Überführung in organische Speicherformen wie Arsenozucker oder -lipide (EDMONDS & FRANCESCONI, 1998; DEMBITSKY & LEWITSKY, 2004). Ein Teil davon wird exkretiert und kann anschließend durch Phytoplankton und Makroalgen in weitere komplexe Verbindungen, hauptsächlich zu Arsenobetain,

verstoffwechselt werden (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2002). Über die Aufnahme von Algen und Plankton durch marine Organismen (z.B. Fische, Krustentiere) akkumulieren die Arsenverbindungen in deren Gewebe, wodurch Arsenkonzentrationen bis zu > 100 mg As/kg T erreicht werden können (FRANCESCONI & KUEHNELT, 2002). Beim Verzehr von Meeresfrüchten kann der Mensch somit größere Mengen an Arsen aufnehmen. Die mittlere tägliche Arsenaufnahme in Korea wurde in einer Untersuchung anhand analysierter Arsengehalte in Lebensmitteln und deren Verzehrsmenge auf 320 µg kalkuliert (LEE *et al.*, 1976). VAHTER (1994) geht bei hohem Fisch- und Schalentierverzehr sogar von einer Aufnahme > 1000 µg an organischem Arsen pro Tag aus. Die mittlere Arsenaufnahme in den USA und Kanada wurde dagegen auf 8 bis 14 bzw. 5 bis 13 µg/d geschätzt, mit einem Anteil an anorganischem Arsen von 21 bis 40 % der Gesamtmenge (YOST *et al.*, 1998). Allerdings ist Arsenobetain, als Hauptvertreter der organischen Arsenverbindungen in marinen Organismen (bis zu > 95 %; VAHTER, 1994; EDMONDS & FRANCESCONI, 1998), metabolisch inert (CHAPPELL *et al.*, 1998) und wird rasch und unverändert über den Urin wieder ausgeschieden (CRECELIUS, 1977), sodass keine toxischen Wirkungen zu befürchten sind (LAWRENCE *et al.*, 1986).

Der NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) für Arsen in anorganischer Form beträgt 150 µg As/d (WHO, 1983). Der NOAEL gibt die höchste Dosis eines Stoffes an, die auch bei andauernder Aufnahme keine erkennbaren und messbaren Wirkungen hinterlässt. Eine chronische Exposition mit Arsen oberhalb dieser Grenze, z.B. über arsenbelastetes Trinkwasser, führt zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen wie Hauterkrankungen (Keratose, Bowen's disease, Hyperpigmentierung), peripheren Neuropathien und Gefäßerkrankungen („Blackfoot disease“). Der Krankheitsverlauf endet häufig mit der Ausbildung von Krebs (der Haut, Lunge, Blase, Niere, Leber; SMITH *et al.*, 1992) tödlich (ABERNATHY *et al.*, 1999).

Die Aufnahme von Arsenat in Zellen erfolgt in tierischen Organismen über Phosphattransporter, wie in *in vitro*-Untersuchungen mit verschiedenen Zelltypen (Tubuluszellen der Ratte, humane Erythrocyten und Karzinomzellen) nachgewiesen werden konnte (KENNEY & KAPLAN, 1988; CHEN *et al.*, 1990; HUANG & LEE, 1996). Arsenit kann laut einer *in vitro*-Studie mit einer humanen Nasopharynxkarzinomzelllinie durch Diffusion in Zellen gelangen (HUANG & LEE, 1996). Daneben kann dessen Aufnahme auch über die Aquaglyceroporine AQP 7 und 9 erfolgen, untersucht an Aquaglyceroporinen des Menschen und der Ratte (LIU *et al.*, 2004). In den Zellen wird Arsen grundsätzlich über eine Kaskade abwechselnder Methylierungs- und

Reduktionsreaktionen entgiftet (Abb. 1). Dies gilt sowohl für den Menschen, als auch für die meisten tierischen Organismen, mit Ausnahme einiger weniger Tierarten, die nicht oder nur in begrenztem Umfang in der Lage sind, Arsen zu methylieren (z.B. Puten, Schimpanse, Krallenaaffe, Meerschwein) (APOSHIAN, 1997).

Im ersten Schritt wird die AS^V durch die Arsenat-Reduktase unter Verbrauch von reduziertem Glutathion (GSH) zu AS^{III} reduziert. Durch die Arsenitmethyltransferase wird diese anschließend zu Monomethylarsonsäure (MMA^V) methyliert, wobei S-Adenosylmethionin als Methylendonator fungiert und dabei zu S-Adenosylhomocystein umgewandelt wird. Eine nichtenzymatische Methylierung durch Methylcobalamin in Gegenwart von GSH und Selenit ist ebenfalls möglich. Es schließt sich ein weiterer Reduktionsschritt (mit GSH) an. Die entstehende Monomethylarsonige Säure (MMA^{III}) wird erneut methyliert (MMA^{III} -Methyltransferase) und es entsteht Dimethylarsinsäure (DMA^V). Nach SUR *et al.* (2003) ist DMA^V mit 50 bis 80 % der Hauptmetabolit im Harn neben geringen Mengen an MMA^V , AS^V und AS^{III} . Laut einem *in vitro*-Versuch von PETRICK *et al.* (2000) sind die organischen Arsenverbindungen MMA^{III} und DMA^{III} aber ebenso hoch toxisch einzustufen, wie anorganisches Arsen.

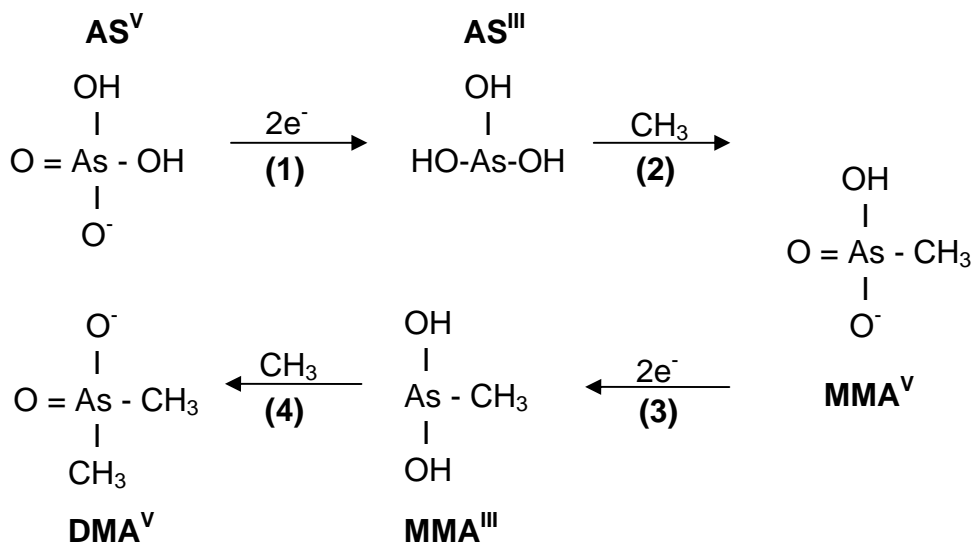


Abbildung 1: Metabolismus des Arsens im Menschen (in Anlehnung an MÜCKTER, 2002)

(1) Arsenatreduktase, (2) Arsenitmethyltransferase, (3) MMA^V -Reduktase, (4) MMA^{III} – Methyltransferase
 AS^V – Arsensäure, AS^{III} – arsenige Säure, MMA^V – Monomethylarsonsäure, MMA^{III} – Monomethylarsonige Säure, DMA^V – Dimethylarsinsäure

Es wird jedoch davon ausgegangen, dass das Entgiftungspotenzial von Arsen im Organismus durch eine Sättigung der metabolischen Prozesse begrenzt ist (NORTH, 1992). Durch eine anhaltende Arsenaufnahme werden Zielgewebe in hohen Dosen mit

anorganischem Arsen konfrontiert (NORTH, 1992). Es kommt zu Schädigungen auf histologischer und physiologischer Ebene. Vor allem enzymatisch katalysierte Reaktionen sind hierbei betroffen (siehe Kapitel 2.4).

In der Höhe der Toleranz gegenüber Arsen existiert auch eine interindividuelle Variabilität. Diese resultiert aus genetischen Polymorphismen der bei der Entgiftung wirkenden Glutathion-S-Transferasen (GST; katalysiert die Konjugation von GSH an Arsen) und bedingt eine unterschiedliche Sensibilität in der Ausbildung von Krebserkrankungen. Innerhalb der europäischen Bevölkerung weisen 30 bis 60 % der Menschen eine Defizienz von GST M₁ und ca. 38 % der Menschen einen Mangel an GST T₁ auf (RENZ, 2003). Den Betroffenen wird durch die fehlende oder mangelnde Entgiftungsaktivität von GST M₁ bei einer Exposition mit kanzerogenen Substanzen (die z.B. beim Rauchen eingeatmet werden) ein erhöhtes Risiko einer Krebsentstehung zugeschrieben (CHIOU *et al.*, 1997). Dies wurde in verschiedenen Untersuchungen bestätigt (BELL *et al.*, 1993; ZHONG *et al.*, 1993). Weiterhin beschrieben CHIOU *et al.* (1997) eine veränderte Dynamik zwischen der Methylierungsfähigkeit und der Akkumulation im Körper durch genetische Polymorphismen von GST M₁ und GST T₁. Eine durch GST-Mangel hervorgerufene verminderte Methylierung von Arsen könnte, wie bereits von NORTH (1992) beschrieben, dessen Retention im Körper und folglich das Risiko gesundheitlicher Schäden erhöhen. Parallelen zu Wiederkäuern sind denkbar.

Bei Auslastung der Entgiftungsprozesse wird Arsen vorübergehend in den Organen gespeichert. DANG *et al.* (1983) wiesen in Lunge, Milz, Leber und Niere die höchsten Arsenkonzentrationen nach. Im Gehirn akkumulierte dagegen nur wenig Arsen. In Gewebeproben unbelasteter Personen wurden in Haut, Aorta, Nebenniere, Niere, Pankreas und Magen die höchsten Arsenkonzentrationen analysiert (CROSS *et al.*, 1979; YAMAUCHI & YAMAMURA, 1983). In der Milz und im Gehirn wurden nur geringe Mengen gefunden. Durch die Affinität zu Thiolgruppen bindet Arsen auch in größerem Maße an das cysteinreiche Protein Keratin und kann somit in Haaren und Nägeln (als typische Biomarker einer chronischen Arsenbelastung) nachgewiesen werden (YÁNEZ *et al.*, 2005).

2.3 Arsen in Pflanzen und Mikroorganismen

Im Boden gelöstes Arsen (als Arsenit oder Arsenat) ist die für Pflanzen verfügbare Form anorganischen Arsens (MEHARG & HARTLEY-WHITAKER, 2002). Arsenit gelangt nach MEHARG & JARDINE (2003) über Glycerol-Transporter in die Wurzel und passiert die

Zellmembranen vermutlich über major intrinsic Proteine (Aquaporine). Arsen induziert in der Pflanze die Biosynthese von Phytochelatinen (GSH-Oligomere = [γ -Glutamat-Cystein]_n-Glycin; n = 2 bis 11) und kann durch Bindung daran komplexiert werden (SCHMÖGER *et al.*, 2000). Der Arsen-Phytochelatin-Komplex wird in Vakuolen transportiert, welche als Speicherort fungieren. Deren saures Milieu wirkt einer reduktiven Dissoziation des Komplexes entgegen (VÖGELI-LANGE & WAGNER, 1990). Die Aufnahme von Arsenat in die Wurzel erfolgt durch die Phosphat-Transporter I und II und steht so in Konkurrenz mit der Phosphat-Aufnahme der Pflanzen (ULLRICH-EBERIUS *et al.*, 1989). Durch die geringere Affinität von Arsenat im Vergleich zum Phosphat kann die Arsenaufnahme durch die Pflanzen bei Erhöhung des Phosphatanteiles im Boden vermindert werden (MACNAIR & CUMBES, 1987). Einige Pflanzen (z.B. *Holcus lanatus*, *Calluna vulgaris*, *Silene vulgaris*) sind auch in der Lage, die Arsenat-Aufnahme durch Suppression des Phosphattransporters mit der höheren Affinität zu Arsenat, zu minimieren (MEHARG & MACNAIR, 1992). Der Transport von Arsen in die oberirdischen Pflanzenteile ist eher gering (SNELLER *et al.*, 1999; GULZ *et al.*, 2005). Dennoch konnten in verschiedenen Untersuchungen mit einer hohen Arsenkonzentration im Nährmedium der Pflanzen erhöhte Arsengehalte in oberirdischen Pflanzenteilen nachgewiesen werden (MACHLIS, 1941; CARBONELL-BARRACHINA *et al.*, 1995). Es traten Schäden wie Verminderung von Wachstum und Fruchtertrag, Plasmolyse und Entfärbung der Wurzeln, Welken und Nekrosen von Blattspitzen und -rändern ein.

Daneben existieren auch Pflanzen, die Arsen in hohen Mengen ohne Toxizitätserscheinungen anreichern können. *Agrostis*-Spezies (Straußgräser) und *Jasione montana* (Berg-Sandglöckchen) akkumulierten laut einer Untersuchung von PORTER & PETERSON (1975) bis zu mehr als 6000 mg As/kg T auf stark arsenbelasteten Böden (bis zu 27000 mg/kg T). Der höchste Gehalt an Arsen in *Agrostis tenuis* wurde im Samen (2000 mg As/kg T) und alten Blättern (1200 mg/kg T; vereinzelt bis 10000 mg As/kg T) nachgewiesen. (Der Arsengehalt der Wurzel wurde hier nicht analysiert.) Verschiedene Farnarten der Gattung *Pteris* wurden als Hyperakkumulatoren für Arsen identifiziert (MA *et al.*, 2001, ZHAO *et al.*, 2002) und werden als Phytoremediatoren zur Sanierung arsenbelasteter Böden diskutiert (FRANCESCONI *et al.*, 2002b). Die Speicherung des Arsens findet hier vorrangig in anorganischer Form in den Wedeln statt (FRANCESCONI *et al.*, 2002b). In einer Untersuchung mit einer Arsenapplikation von 500 mg As/kg Kompost wurden bei entsprechend hoher Arsenaufnahme in den Farnwedeln Arsenkonzentrationen von 6200 bis 7600 mg As/kg T gemessen (ZHAO *et al.*, 2002).

Die Aufnahme von Arsenat und Arsenit durch Mikroben erfolgt ähnlich wie in Pflanzen. Als Phosphatäquivalent gelangt Arsenat über zwei verschiedene Phosphattransportsysteme in die Mikroorganismen. Unter normalen Umständen kann Arsenat über den Pit-Transporter in die Zelle aufgenommen werden. Unter Phosphatmangel wird das Pst-System aktiviert, welches eine 100fach stärkere Affinität gegenüber Phosphat besitzt (BRUINS *et al.*, 2000). Durch Inaktivierung des Pit-Systems können Mikroben einer hohen Arsenaufnahme entgegenwirken (NIES & SILVER, 1995). Es wird vermutet, dass Arsenit durch ein Glycerol-Transport-Protein, ein Mitglied der Aquaglyceroporin-Familie, in die Mikroben gelangt (ROSEN, 2002).

Resistenzmechanismen gegenüber Arsen sind auf Chromosomen oder Plasmiden vieler Mikroben (Bakterien und Archaeen) genetisch determiniert (CARLIN *et al.*, 1995; JACKSON & DUGAS, 2003). Dieses sogenannte *ars*-System umfasst mehrere Gene, die in Abhängigkeit der Spezies in ihrer Anzahl differieren können (SILVER & PHUNG, 1996) und deren Translation durch die Aufnahme von Arsenat bzw. Arsenit induziert wird (SILVER *et al.*, 1981). Zu den synthetisierten Proteinen gehören die cytoplasmatische Arsenat-Reduktase (ArsC), Arsenit-spezifische Membranpumpen (ArsB, meist in Kombination mit ArsA) und regulatorische Elemente (Repressor und Co-Repressor = ArsR und ArsD). Deren Zusammenspiel kann eine effektive Elimination von Arsen bewirken: Arsenat wird enzymatisch (ArsC) unter Oxidation von GSH zu Arsenit reduziert und kann somit über die Arsenit-Pumpen (ArsB mit ArsA) unter Energieverbrauch ausgeschleust werden (SILVER & PHUNG, 2005; STOLZ *et al.*, 2006). Eine Inaktivierung dieser Genabschnitte führte zu einer Hypersensitivität gegenüber Arsen (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurden in Bakterien Arsenit-Oxidasen und Arsenat-Reduktasen identifiziert (AHMANN *et al.*, 1994; SANTINI *et al.*, 2000). Die Oxidation von Arsenit als Entgiftungsprozess findet vorrangig im aeroben Milieu statt, die Reduktion von Arsenat meist unter anaeroben Bedingungen (MACUR *et al.*, 2004).

Mikroben besitzen neben Resistenzmechanismen ebenfalls die Fähigkeit, Arsen durch Methylierung zu entgiften. Dabei wird Arsenat zu Arsenit reduziert und in die Verbindungen MMA^V, DMA^V und Trimethylarsinoxid (TMAO) überführt (PONGRATZ, 1998; TURPEINEN *et al.*, 2002). Diese können unter reduzierenden Bedingungen durch anaerobe und auch aerobe Mikroorganismen in ihre korrespondierenden gasförmigen Arsin-Verbindungen (Arsin, Monomethylarsin, Dimethylarsin, Trimethylarsin) umgewandelt werden (CULLEN & REIMER, 1989) und gelangen in dieser Form als

hochgiftige Arsenverbindungen in die Atmosphäre. Durch Oxidationsprozesse wird anorganisches Arsen freigesetzt, welches durch Regen oder Ausfällung wieder zurück auf die Erde gelangt (PONGRATZ, 1998).

Obwohl die bisherigen Erkenntnisse zur Entgiftung von Arsen durch Mikroben einige Rückschlüsse auf den Metabolismus der Einzeller im Pansen zulassen, ist dieses Gebiet eher unzureichend untersucht. Gründe dafür liegen in der Artenvielfalt (vorwiegend anaerobe Bakterien, Archaeen, Protozoen und Pilze) und der Variation in der mikrobiellen Gemeinschaft, sowie in der Kultivierung einer repräsentativen Mikroflora unter Laborbedingungen. FORSBERG (1978) stellte bei einigen Bakterienstämmen *in vitro* eine stärkere Sensitivität gegenüber Arsen fest im Vergleich zu Protozoen, jeweils gemessen anhand der Fermentationsaktivität. Als Ursache wurden Unterschiede in der Fähigkeit, Arsen aufzunehmen, diskutiert. Aber auch zwischen einzelnen Bakterienstämmen variierte die Menge und Geschwindigkeit der Aufnahme, sowie die Sensitivität gegenüber Arsen.

2.4 Wirkung von Arsen auf molekularer Ebene

Die Toxizität von Arsenit beruht auf der Bindung an Sulfhydryl-Gruppen von Enzymen und anderen Proteinen, was zu Einschränkungen in der biologischen Funktion führen kann. Demgegenüber kann Arsenat in enzymkatalysierten Reaktionen Phosphat substituieren und somit Reaktionswege unterbrechen (SCOTT *et al.*, 1993).

Funktionseinschränkungen durch Arsen wurden unter anderem für verschiedene Enzyme der β -Oxidation, des Proteinstoffwechsels und des Kohlenhydratstoffwechsels festgestellt (BARRON & SINGER, 1945; REIN *et al.*, 1979; SHEABAR & YANNAL, 1989; REICHL *et al.*, 1989; PETRICK *et al.*, 2000; PAL & CHATTERJEE, 2005). Der Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplex (PDH) wurde intensiv untersucht und gilt als äußerst sensitives Enzym gegenüber Arsenit. Dessen Inhibierung durch Bildung inaktivierender Arsenkomplexe mit dem Cofaktor α -Liponsäure führt bereits in physiologisch relevanten, mikromolaren Konzentrationen (HU *et al.*, 1998) zu einer unmittelbaren Blockade des Citratzyklus (PETRICK *et al.*, 2000), der maßgeblich für die Produktion von Reduktionsäquivalenten verantwortlich ist. Infolge dessen traten bereits nach einmaliger Arsenapplikation Verschiebungen im Gehalt von Kohlenhydrat-Metaboliten auf (REICHL *et al.*, 1989). Bei mehrmaliger Applikation (über 5 d) wurde eine Abnahme von Metaboliten des Kohlenhydratstoffwechsels (z.B. Glykogen, Pyruvat, α -Ketoglutarat, Acetyl-CoA), und eine Zunahme der Verhältnisse Laktat/Pyruvat und Hydroxybutyrat/Acetoacetat

festgestellt. Zusätzlich gingen diese Abläufe mit dem Erliegen der Glukoneogenese und der Erschöpfung des Kohlenhydrathaushaltes der Leber einher.

Die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung durch Arsenat beruht auf der Substitution von Phosphat und der Bildung von instabilem ADP-Arsenat anstelle von ATP (GRESSER, 1981; MOORE, 1983). ADP-Arsenat diente im *in vitro*-Versuch mit geringer Affinität als Substrat der Hexokinase, wobei Glukose-6-Arsenat gebildet wurde (GRESSER, 1981). Diese Mechanismen können theoretisch zu Störungen im Glukose-Stoffwechsel und der Energiegewinnung führen. Die erforderlichen Mengen für diese Auswirkungen *in vivo* sind jedoch bei geringer chronischer Arsenaufnahme physiologisch irrelevant (TSENG, 2004).

Die Kanzerogenität von Arsen soll aufgrund der Komplexität des Themas nur am Rande erwähnt werden. Mechanismen, wie beispielsweise die Hemmung von DNA-Reparatur-Enzymen und die Induktion von oxidativem Stress wurden hierbei als mutmaßliche Ursache von *in vivo* und *in vitro* hervorgerufenen Chromosomenmutationen und DNA-Schäden diskutiert (GEBEL, 2001; SCHUHMACHER-WOLZ *et al.*, 2007).

Die parallele Wirkung beider Formen von Arsenat und Arsenit resultiert in Störungen multipler metabolischer Systeme der Zelle und führt letztendlich zum Zelltod (BANAFSCHEH, 2004).

Dennoch wird aufgrund der Essentialität von Arsen ein Bedarf von 12 µg As/d für den Menschen veranschlagt (UTHUS, 1992). Es wird angenommen, dass Arsen im Organismus eine Rolle im Methionin-Metabolismus spielt, jedoch konnte die Funktion des Arsens dahingehend bisher nicht eindeutig geklärt werden (UTHUS, 2003).

3 Untersuchungsansätze und Zielstellung

Die toxische Wirkung von Arsen im tierischen Organismus ist von mehreren Faktoren abhängig: von der Löslichkeit der Verbindung, der Art und Höhe der Applikation, dem Alter der Tiere, deren Ernährungsstatus und deren individueller biologischer Reaktion (CASE, 1974). Für die Belastung des Fleisches mit Arsen sind die Art und Höhe der aufgenommenen Arsenspezies, sowie die Zeit der Exposition von Bedeutung (SELBY *et al.*, 1974). Bereits Mitte des 20. Jahrhunderts wurde erkannt, dass Arsen in organischer Form (z.B. als Roxarson) das Wachstum von Schweinen stimulierte (CARPENTER, 1951) und bei Geflügel neben der Steigerung der Legeleistung und Pigmentierung ebenfalls eine wachstumsfördernde und coccidiostatische Wirkung entfaltete (BIRD *et al.*, 1948; MOREHOUSE & MAYFIELD in BIRD *et al.*, 1948; CHIOU *et al.*, 1997). Teilweise werden heute noch organische Arsenverbindungen als leistungsfördernde Zusatzstoffe (hauptsächlich in den USA) in der Fütterung eingesetzt. BUCY *et al.* (1954) führten dahingehend Versuche an Lämmern durch, konnte jedoch keine stimulierenden Effekte feststellen.

Zur Überprüfung der Wirkung einer Substanz können *in vitro*- und *in vivo*-Studien herangezogen werden. Beide Formen weisen Vor- und Nachteile auf, die es zu berücksichtigen gilt. *In vitro*-Untersuchungen haben den Vorteil, dass viele Varianten und diese in vielen Wiederholungen getestet werden können. Auch Varianten, die dem Tier gesundheitliche Schäden zufügen könnten sind überprüfbar. Der Aufwand und der Verbrauch an Probenmaterial sind geringer, was den Kostenfaktor begünstigt. Nachteilig ist jedoch beispielsweise die begrenzte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den tierischen Organismus. Dennoch sind Untersuchungen, die direkt am Tier durchgeführt werden aussagekräftiger, wenn auch tierindividuelle Unterschiede höhere Schwankungen zwischen den Ergebnissen bedingen können.

Ein *in vitro*-Ansatz zur Beurteilung der Abbaubarkeit von Rohnährstoffen ist die Inkubation von Futter mit nativem Pansensaft im Pansensimulationssystem (Rusitec; rumen simulation technique). Zusätzlich können hierbei noch Aussagen zur Quantität und Qualität der mikrobiellen Rohproteinsynthese getroffen werden. Auch anhand des *in situ*-Verfahrens, bei dem Futterbeutel direkt im Pansen des Tieres eingesetzt werden (Nylonbeuteltechnik), kann der Abbau von Nährstoffen untersucht werden.

Eine Überprüfung des Einflusses von Futter oder einer Futterzulage auf die Fermentationsaktivität der Pansenmikroben kann anhand der Höhe der Gasbildung im Verlauf der Zeit erfolgen. Hierzu kann ein *in vitro*-Verfahren genutzt werden, welches ursprünglich der Energiewertschätzung eines Futtermittels diente (Hohenheimer Futterwerttest, HFT).

Zur Beurteilung der Akkumulation von Substanzen im Tierkörper können Fütterungsversuche mit der zu prüfenden Komponente durchgeführt werden. Diese kann hinsichtlich der Dosierung und Bindungsform variieren bzw. in Kombination mit weiteren Substanzen verabreicht werden.

Verdaulichkeitsversuche werden zur Untersuchung des Rohnährstoffabbaus des Futters im Tier herangezogen. Dies kann zusätzlich in Abhängigkeit eines zu überprüfenden Einflussfaktors (z.B. Art oder Beschaffenheit des Futters, Zulage oder Entzug von Substanzen) geschehen. Durch eine quantitative Kotsammlung und nach Ermittlung der Rohnährstoffgehalte im Futter und Kot kann die Verdaulichkeit berechnet werden. Die Rohnährstoffverdaulichkeit in bestimmten Abschnitten des Gastrointestinaltraktes ist durch die Entnahme von Chymus oder Darminhalt bestimmbar, indem über Fisteln oder nach der Schlachtung der Tiere die entsprechenden Abschnitte beprobt werden.

Unter Anwendung einiger der genannten *in vitro*- und *in vivo*-Verfahren sollte verschiedenen Fragestellungen bezüglich eines Einflusses von Arsen nachgegangen werden.

In *in vitro*-Versuchen zur Gasbildungsdynamik und Pansensimulation wurde einerseits die Wirkung einer Zulage von arsenhaltiger Erde zum Futter überprüft und andererseits die Wirkung zweier synthetischer Arsenverbindungen (mit unterschiedlicher Toxizität und in mehreren Dosisstufen) auf die mikrobielle Fermentation bei der Inkubation von Futter mit nativem Pansensaft. Verschiedene Parameter wurden hierbei untersucht: der Abbau von Rohnährstoffen, die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese und die Gasbildung. Der Einsatz der synthetischen Arsenverbindungen erfolgte vor dem Hintergrund einer möglichen hohen Löslichkeit und Toxizität von Arsen in der Erde unter entsprechenden Umweltbedingungen.

In Verdaulichkeitsversuchen mit Hammeln sollten Auswirkungen einer Zulage arsenhaltiger Erde in Kombination mit verschiedenen Futtermitteln und die Wirkung einer synthetischen Arsenverbindung auf die Verdaulichkeit von Rohnährstoffen überprüft werden. Zusätzlich erfolgte eine Gegenüberstellung des aufgenommenen und

ausgeschiedenen Arsens und es wurde die Abreicherung aus dem Körper der Tiere über den Kot 12 Tage lang verfolgt.

In einem Langzeitversuch mit Mutterschafen und Lämmern wurde die Akkumulation des Arsens (als synthetische Arsenverbindung) in verschiedenen Geweben, sowie Milch und Blutserum zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Dazu erhielten sowohl Mutterschafe als auch Lämmer ein mit Arsen angereichertes Futter. Weiterhin wurde eine transplazentare Arsenübertragung in das Lamm untersucht. Versuchsbegleitend wurden verschiedene Blutwerte (Hämoglobin, Hämatokrit, Leukocyten, und Erythrocytengehalt) der Mutterschafe erfasst und ein Einfluss des Arsens auf metabolischer Ebene anhand der Messung von Enzymaktivitäten überprüft.

Eine Analyse der als äußerst sensitiv gegenüber Arsen geltenden PDH wurde zwar versucht, erwies sich aber als methodisch problematisch. Stattdessen wurde die Aktivität von zwei weiteren Enzymen des Kohlenhydrat-Stoffwechsels untersucht, der Pyruvatkinase und der Hexokinase bzw. der in der Leber vorkommenden Isoform Glukokinase. Alle drei Enzyme sind Schlüsselenzyme des Glukosestoffwechsels. Die Hexokinase und Glukokinase katalysieren die Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat als ersten Schritt der Glykolyse. Die Pyruvatkinase katalysiert die Umwandlung von Phosphoenolpyruvat in Pyruvat und stellt damit der PDH das Substrat für die Herstellung von Acetyl-CoA als wichtigen Reaktionspartner im Citratzyklus zur Verfügung. Die Funktionalität dieser Enzyme hängt, wie bereits erwähnt, vom Zustand ihrer Thiolgruppen ab. Infolge einer Reaktion der Thiolgruppen mit verschiedenen Substanzen konnte bereits durch mehrere Autoren eine Aktivitätsbeeinträchtigung nachgewiesen werden (GRIFFITHS, 1949; LAZARUS *et al.*, 1968; OTIENO *et al.*, 1975; FELL *et al.*, 1974).

Die im Pansen gebildeten kurzkettigen Fettsäuren (Acetat, Butyrat und Propionat) tragen zwar schätzungsweise zu 70 % zur Energieversorgung des Wiederkäuers bei (BERGMAN, 1990), dennoch findet auch die Oxidation von Glukose statt (WILSON *et al.*, 1983). MCDOWELL (1983) spricht dem Wiederkäuer dabei einen Glukosebedarf ähnlich dem des Monogastriers zu. Obwohl bereits die Existenz intestinaler und ruminaler Glukosetransporter belegt wurde (SHIRAZI-BEECHEY *et al.*, 1991, ASCHENBACH *et al.*, 2000), die Kohlenhydrate jedoch annähernd vollständig durch die Pansenmikroben zu kurzkettigen Fettsäuren fermentiert werden können (in Abhängigkeit vom Futtermittel), muss die Glukose fast ausschließlich über den Stoffwechselweg der Glukoneogenese

synthetisiert werden (im Leberparenchym und in der Nierenrinde). Als Ausgangsstoffe dienen dabei hauptsächlich glukoplastische Aminosäuren, Laktat, Glycerin und Propionat (SALLMANN & FUHRMANN, 2005). Glukose dient (neben der Energiegewinnung) hauptsächlich der Energieversorgung des Gehirns, dem Aufbau von Glykogen, der Ernährung des Fötus und der Synthese von Laktose im Euter (WILSON *et al.*, 1983).

Da das Risiko einer erhöhten Arsenaufnahme durch den Endverbraucher über den Verzehr kontaminierter tierischer und pflanzlicher Lebensmittel bisher eher in geringerem Ausmaß betrachtet wurde, sollte anhand der vorliegenden Arbeit auch abgeschätzt werden, inwieweit das angereicherte Arsen im Tier – als Bindeglied der Nahrungskette zwischen Pflanze und Mensch – ein Gefährdungspotential für den Konsumenten darstellt.

Zusammenfassend betrachtet sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen geklärt werden:

- Nimmt Arsen Einfluss auf die mikrobielle Fermentation bzw. Verdaulichkeit und auf die mikrobielle Proteinsynthese?
- Sind Unterschiede im Grad der Wirkung zwischen 3-wertigem und 5-wertigem Arsen erkennbar?
- Wie schnell wird Arsen aus dem Körper eliminiert?
- Findet eine Akkumulation von Arsen im Tierkörper statt?
- Wird Arsen transplazentar übertragen und führt dies zu einer Vorbelastung im Lamm? Welche Rolle spielt die Aufnahme von Arsen über die Milch?
- Nimmt Arsen Einfluss auf hämatologischer und enzymatischer Ebene?
- Wie ist ein Arseneintrag in die Nahrungskette des Menschen zu bewerten?

Dabei ist anzumerken, dass in den Versuchen Arsen in Konzentrationen eingesetzt wurde, wie sie auch in der Umwelt existieren könnten. Mit Hilfe der erwähnten Untersuchungsansätze wurde den Fragestellungen nachgegangen.

4 Überblick zum Versuchsaufbau

Eine Arsenkontamination des Futters wurde in den *in vivo*- und *in vitro*-Versuchen auf zwei Arten nachgeahmt (Abb. 2). Einerseits wurde eine arsenhaltige Erde aus dem Überschwemmungsgebiet der Mulde (Sachsen) eingesetzt und zum anderen 2 synthetische Arsenverbindungen.

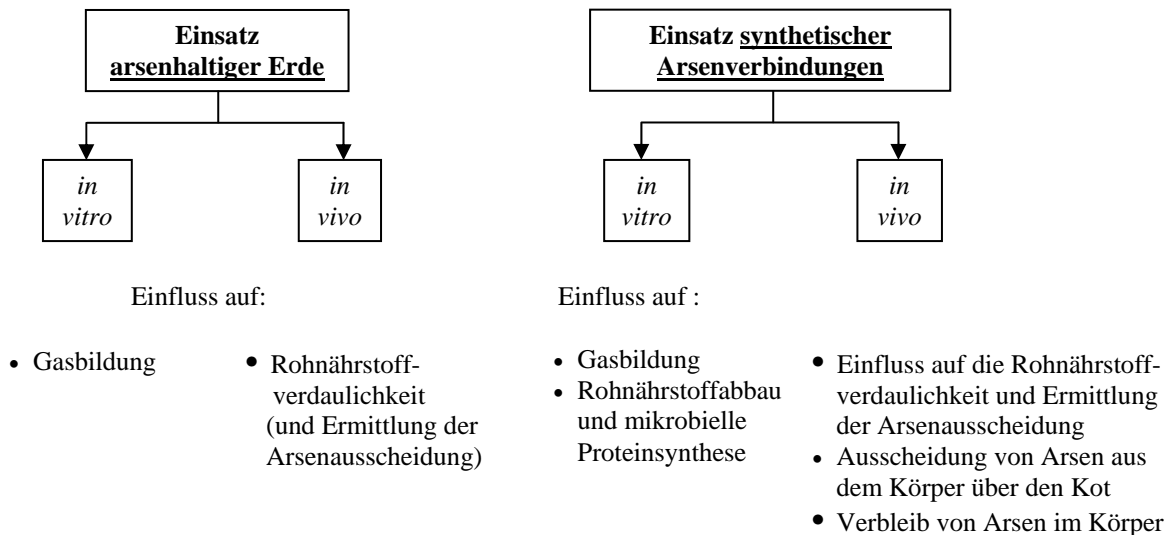


Abbildung 2: Übersicht zur Versuchsplanung

Die Gasbildung *in vitro* wurde in einem modifizierten HFT erfasst und der Abbau der Rohrnährstoffe, sowie die mikrobielle Proteinsynthese *in vitro* mit Hilfe eines Pansensimulationssystems überprüft. Die Rohrnährstoffverdaulichkeit *in vivo* wurde in einem Verdaulichkeitsversuch an Hammeln ermittelt. Hierbei wurde auch eine Gegenüberstellung der aufgenommenen und ausgeschiedenen Arsenmenge vorgenommen. In einem Langzeit-Fütterungsversuch mit tragenden Mutterschafen wurde unter anderem die Anreicherung von Arsen in verschiedenen Geweben von Lämmern und Mutterschafen untersucht.

Der Einsatz arsenbelasteter Erde sollte die natürliche Kontamination des Grünfutters mit anhaftenden Bodenpartikeln simulieren. Die Wahl zweier synthetischer Arsenverbindungen erfolgte mit dem Ziel, deren Toxizität anhand der Intensität der Wirkung zu vergleichen, da es, wie erwähnt, in der 3-wertigen Form (als Arsenit) als toxischer gilt als

in der 5-wertigen Form (als Arsenat). Beide Formen können gelöst im Boden vorhanden sein.

Im weiteren Verlauf der Arbeit erfolgt eine Unterteilung der Untersuchungen in „*in vitro*- und „*in vivo*-Studien“. Eine Ausnahme stellt der Verdaulichkeitsversuch mit dem Einsatz arsenkontaminierter Erde dar. Er wurde aufgrund der engen Themenverwandtschaft dem Kapitel „*in vitro*-Studien“ zugeordnet.

5 *In vitro*-Studien: Material und Methoden

Mit der Durchführung der nachfolgend beschriebenen Versuche sollte ein Einfluss von Arsen aus zwei unterschiedlichen Quellen (Erde und synthetische Verbindungen) und in unterschiedlichen Wertigkeitsstufen (als 3- und 5-wertige Arsenverbindungen) überprüft werden. Zum Einen wurden Auswirkungen auf die Gasbildung bei der mikrobiellen Fermentation untersucht, zum Anderen ein Einfluss auf den Rohnährstoffabbau.

5.1 Spendertiere

Zur Gewinnung von Panseninhalt für die *in vitro*-Versuche standen 5 fistulierte Schafe der Rasse Schwarzköpfiges Fleischschaf im Nutztierwissenschaftlichen Zentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Merbitz zur Verfügung. Deren tägliche Futterration bestand aus Wiesenheu mittlerer Qualität *ad libitum*, 200 g pelletiertem Konzentratfutter („Schäferstolz“, Mischfutter und Landhandel GmbH, Edderitz, Tab. A1) und 10 g einer Mineralstoffmischung (BASU-Mineralfutter für Schafe, Rezept Nr.: 9501, Themar; Tab. A2). Ein Zugang zu frischem Wasser war stets gewährleistet. Die Haltung der Tiere erfolgte auf Tiefstreu in einer überdachten Gruppenbucht mit bis zu drei Tieren und unter außenklimatischen Bedingungen.

Die Entnahme des Pansensaftes fand jeweils vor der morgendlichen Fütterung statt. Mittels eines Rohres aus Edelstahl, an dessen Ende sich ein siebförmig perforierter Aufsatz befand, konnte den Schafen über die Pansenfistel unter Ausschluss von größeren Futterpartikeln flüssige Phase mit Hilfe einer Kunststoff-Spritze (120 ml) abgesaugt werden. Zur weiteren Filtration wurde der Pansensaft zusätzlich durch ein Leinentuch gepresst und anschließend bis zur Verwendung in einem vorgewärmten Thermobehälter und weitestgehend unter Luftabschluss aufbewahrt (max. 1,5 h).

Die Entnahme von fester Phase des Panseninhaltes erfolgte vor der Gewinnung des Pansensaftes. Dazu wurde eine Vorrichtung aus 2 ineinander verschiebbaren Rohren (Kunststoff und Edelstahl, Ø Hohlraum ca. 1,3 cm, Länge ca. 60 cm) über die Fistel in den Pansen eingeführt, die dann über eine Aussparung feste Phase aufnehmen konnte. Durch eine Drehung der Rohre gegeneinander wurde die Öffnung verschlossen und der Stab konnte zur Entnahme der festen Phase wieder aus der Fistel gezogen werden. Die Prozedur wurde so oft wiederholt, bis die erforderliche Menge an festem Panseninhalt gewonnen

war. Dieser wurde abgedeckt in vorgewärmten Bechergläsern bis zum Gebrauch bei 39 °C in einem Trockenschrank aufbewahrt.

5.2 Einsatz arsenhaltiger Erde

5.2.1 Gasbildung

Der HFT (MENKE *et al.*, 1979) wurde ursprünglich entwickelt, um die Umsetzbare Energie (ME) und den Abbau der organischen Substanz eines Futtermittels schätzen zu können. In einer modifizierten Version wurde in dieser Arbeit das gebildete Gasvolumen bei der Inkubation eines Futtermittels mit einer Pansensaft-Puffer-Lösung über 93 h (anstelle von 24 h) verfolgt. Mittels einer regressionsanalytischen Auswertung wurden verschiedene Parameter zur Dynamik der Gasbildung geschätzt.

5.2.1.1 Varianten

Als Futtermittel wurde eine Grassilage mit folgenden Roh Nährstoffgehalten eingesetzt (g/kg T): Rohprotein 117, Rohfaser 351 und Rohfett 9,6. Die Grassilage wurde nach der Gewinnung tiefgekühlt (-18 °C), bis zum Zeitpunkt der Verwendung portionsweise aufgetaut und bei 65 °C für 24 h im Umlufttrockenschrank (Fa. Memmert, Schwabach) getrocknet. Die anschließende Vermahlung erfolgte in einer Zentrifugalmühle (Fa. Fritsch, Pulverisette, Idar-Oberstein) auf 1 mm Siebdurchgang. Daneben wurde ein Konzentratfutter in Anteilen von 0, 20 oder 30 % der T ("Schäferstolz", Mischfutter und Landhandel GmbH, Edderitz; Tab. A1) eingemischt. Ziel dessen war es, über eine Absenkung des pH-Wertes durch die mikrobielle Synthese kurzkettiger Fettsäuren aus dem leicht fermentierbaren Konzentrat eine möglicherweise höhere Verfügbarkeit und damit einen stärkeren Einfluss des Arsens zu erzielen. Den Grassilage-Konzentratmischungen wurde ein Anteil von 6 % arsenarmer oder arsenbelasteter Erde beigemischt (bezogen auf die Originalsubstanz). Die Erde in der Arsenvariante entstammte einem Überschwemmungsgebiet der sächsischen Mulde und enthielt 167 mg As/kg Originalsubstanz, die der Kontrollvariante wurde von einem weniger stark kontaminierten, vergleichbaren Auenboden geborgen und beinhaltete 6,5 mg As/kg Originalsubstanz. Die Grassilage hatte einen natürlichen Arsengehalt von 0,2 mg As/kg T.

In den Varianten mit einem höheren Arsengehalt wurde eine Arsenkonzentration von 10 mg As/kg T angestrebt. In einem zweifaktoriellen Versuchsansatz ergaben sich folgende Versuchsvarianten (Tab. 3):

Tabelle 3: Konzentratgehalt und Arsenkonzentration in den Versuchsvarianten mit arsenhaltiger (+) oder arsenarmer (-) Erde

Variante	Erde	Konzentrat- gehalt (%)	analysierte Arsenkonzentration (mg As/kg T)
1	-	0	0,73
2	+	0	12,32
3	-	20	0,78
4	+	20	11,25
5	-	30	0,71
6	+	30	11,15

5.2.1.2 Vorbereitung der Kolbenprober

Als Inkubationsgefäße wurden Kolbenprober (Fortuna[®], Poulten & Graf, Wertheim) aus Glas mit einer Graduierung in 1,0 ml-Schritten und einem Fassungsvermögen von 100 ml verwendet. Circa 200 mg lufttrockener Substanz an Probenmaterial der entsprechenden Versuchsvariante wurden möglichst tief in den Glaskörper eingebracht. Dieser wurde anschließend durch den mit Vaseline eingefetteten Kolben bis zum Versuchsstart verschlossen. An der Spitze des Kolbenprobers diente ein Silikonschlauch, der auf dem Kapillaransatz aufgesetzt und mit einer verschließbaren Schlauchklemme versehen war, einerseits dem Verschluss des Kolbenprobers, andererseits der Entfernung des gebildeten Gases während des Versuches.

5.2.1.3 Inkubationsmedium

Die Lösung zur Inkubation des Futtermittels bestand aus 474 ml Wasser, 0,12 ml Spurenelementlösung, 237 ml Pufferlösung, 237 ml Mengenelementlösung, 1,22 ml Resazurinlösung, 50 ml Reduktionslösung und 500 ml Pansensaft (Zusammensetzung der

Lösungen siehe Tab. A3). Das Volumen bemaß sich an dem Bedarf für 59 Kolbenprobern und wurde in Abhängigkeit der inkubierten Kolbenproberanzahl entsprechend kalkuliert.

In genannter Reihenfolge wurden das Wasser und die ersten vier Lösungen in eine Woulfe`sche-Flasche gegeben, die in einem auf 39 °C temperierten Wasserbad stand. Unter ständiger CO₂-Begasung wurde die Lösung folglich erwärmt und mittels eines Magnetrührers homogen gehalten. Anschließend wurde eine frisch angesetzte Reduktionslösung (vortemperiert auf 39 °C) zugesetzt, wodurch es zu einem Farbumschlag von einer bläulichen über eine rötliche Lösung bis zur Entfärbung kam. Zur Absenkung der Pufferkapazität (zur Überprüfung des Einflusses eines geringeren pH-Wertes auf die Verfügbarkeit von Arsen aus der Erde) wurde die Pufferlösung 1:2 mit dest. Wasser verdünnt.

Nach 15 min wurden 500 ml des Pansensaftes hinzu gegeben und bis zum Abfüllen der Lösung wurde weiterhin für 15 min mit CO₂ begast.

5.2.1.4 Durchführung

In 2 voneinander unabhängigen Versuchsdurchgängen wurden insgesamt 16 Wiederholungen pro Variante getestet. Zur Korrektur der Eigengasbildung des Pansensaftes wurden in beiden Durchgängen je 3 Kolbenprober ohne Futter, nur mit der Pansensaft-Pufferlösung, parallel mitgeführt.

Die auf 39 °C vorgewärmten Kolbenprober wurden jeweils einzeln über den Silikonschlauch mit 30 ml der Pansensaft-Puffer-Lösung befüllt (ein Benetzen der Probe erfolgte durch vorsichtiges Schütteln des Kolbens), mit der Schlauchklemme verschlossen, und nach der Notierung des Ausgangsvolumens auf zufälliger Position im Rotor eines Brutschrankes angeordnet. Dieser hielt über den gesamten Versuch konstant 39 °C. Der Rotor verfügte über ein Fassungsvermögen von 57 Kolbenprobern und erreichte eine Umdrehungsgeschwindigkeit von 1 min⁻¹. Die Rotation diente der stetigen Durchmischung der inkubierten Proben.

Das Ablesen des gebildeten Gasvolumens erfolgte zu den Zeitpunkten 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 21, 25, 29, 33, 39, 45, 57, 69, 81 und 93 h nach Inkubationsstart. Nach jeweils 9 und 29 h ab Versuchsbeginn wurde durch Öffnung der Schlauchklemme das gebildete Gas entlassen, anschließend die Klemme wieder geschlossen und erneut das aktuelle Volumen notiert.

Es kam vor, dass Kolben während des Versuches durch sandige Verunreinigungen, die sich aus dem Futter gelöst und in der Vaselineschicht gesammelt haben, undicht wurden. Diese wurden für die Auswertung nicht herangezogen.

Ausgehend vom Ausgangsvolumen wurde die Gasbildung (ml) anhand der notierten Volumina von Zeitpunkt zu Zeitpunkt errechnet und je Variante unter Berücksichtigung des Volumens bei der Rückstellung der Kolben kumulativ zusammengefasst. Dabei wurde das gebildete Gasvolumen der Varianten ohne Futter (Blindwerte) jeweils zwischen zwei aufeinanderfolgenden Ablese-Zeitpunkten von dem der inkubierten Futterproben desselben Zeitraumes subtrahiert. Die Gasbildung wurde auf eine absolute Trockenmasse von 200 mg bezogen.

5.2.1.5 Mathematisch-statistische Auswertung

Mit Hilfe der Software GraphPad Prism (Version 4.0 für Windows, GraphPad Software, San Diego California, USA) erfolgte die grafische Darstellung sowie eine regressionsanalytische Auswertung der Daten. Grundlage für die Erstellung der Funktionen waren in jedem Fall die Einzelmesswerte aus allen Messwiederholungen der jeweiligen Variante. An die kumulative Abtragung der gebildeten Gasvolumina über die Zeit wurde eine modifizierte Gompertz-Funktion (BEUVINK & KOGUT, 1993) angepasst (Abb. 3), mit der das Gasbildungspotenzial berechnet werden konnte (Gl. 1). Mit der Annahme, dass die Gasbildung zum Zeitpunkt „0“ bei „0 ml“ lag, wurde festgelegt, dass der Beginn der Funktion am Koordinatenursprung liegt.

Der Zeitpunkt und die Höhe der maximalen Gasbildungsrate konnten durch Bildung der ersten und zweiten Ableitung geschätzt werden (Gl. 2 und 3). Bei $y'' = 0$ entspricht der Wert y' der maximalen Gasbildungsrate und x bezeichnet deren Zeitpunkt. Eine statistische Auswertung dieser Schätzungen konnte nicht vorgenommen werden, da es sich um eine Berechnung auf Basis einer Schätzgleichung handelte und dadurch keine Wiederholungen und Standardfehler – als Voraussetzung zur Ermittlung von Signifikanzen – vorhanden waren. Hier erfolgte ein nominaler Vergleich.

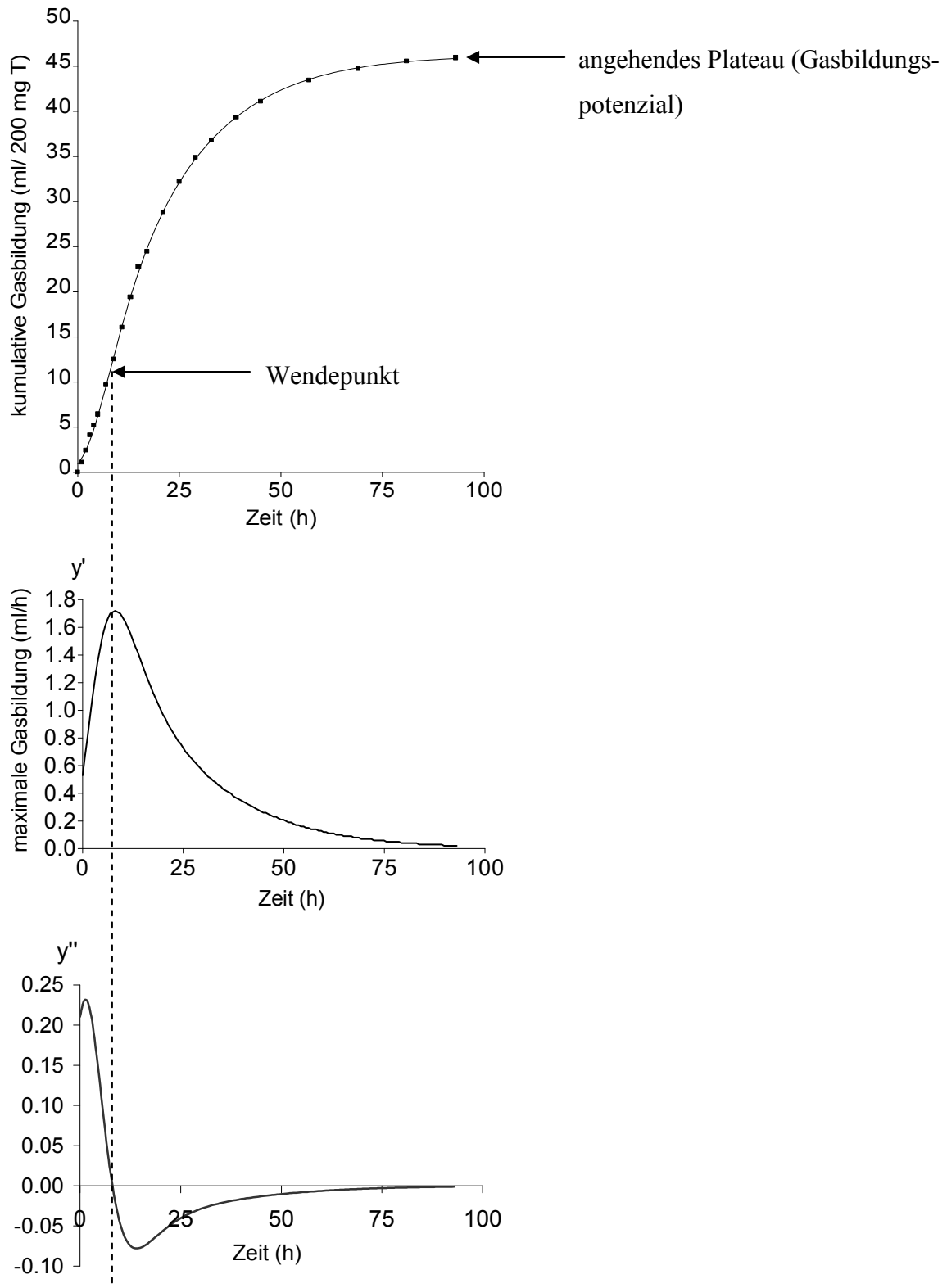


Abbildung 3: Graphische Darstellung der modifizierten Gompertz-Funktion (BEUVINK & KOGUT, 1993) und deren 1. und 2. Ableitung zur Schätzung der maximalen Gasbildung und des Wendepunktes

$$y = b \cdot \exp(-mr/D_r \cdot \exp(-D_r \cdot x) - ms/D_s \cdot \exp(-D_s \cdot x)) \quad (1)$$

Erste Ableitung:

$$y' = b \cdot \exp(-mr/D_r \cdot \exp(-D_r \cdot x) - ms/D_s \cdot \exp(-D_s \cdot x)) \cdot ((mr \cdot \exp(-mr \cdot x)) + ms \cdot \exp(D_s \cdot x)) \quad (2)$$

Zweite Ableitung:

$$y'' = b \cdot \exp(-mr/D_r \cdot \exp(-D_r \cdot x) - ms/D_s \cdot \exp(-D_s \cdot x)) \cdot ((mr \cdot \exp(-mr \cdot x)) + ms \cdot \exp(D_s \cdot x))^2 + b \cdot \exp(-mr/D_r \cdot \exp(-D_r \cdot x) - ms/D_s \cdot \exp(-D_s \cdot x)) \cdot (-D_r \cdot mr \cdot \exp(-D_r \cdot x) - D_s \cdot ms \cdot \exp(-D_s \cdot x)) \quad (3)$$

b – geschätztes Gasbildungspotenzial, mr – Gasbildungsrate für schnell abbaubare Substanz, D_r – delta mr ; Zerfallskonstante für schnell abbaubare Substanz, ms – Gasbildungsrate für langsam abbaubare Substanz, D_s – delta ms ; Zerfallskonstante für langsam abbaubare Substanz, x – entspricht t , dem Zeitpunkt nach Beginn der Inkubation

Das geschätzte Gasbildungspotenzial entspricht dem gesamten Gasvolumen, das bei der Fermentation der Probe im modifizierten HFT maximal gebildet werden kann. Zusätzlich kann zum Zeitpunkt t die Gasbildungsrate der schnell und langsam fermentierbaren Bestandteile (mr bzw. ms) geschätzt werden. Letzteres wurde in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

Statistische Unterschiede wurden durch ein Nicht-Überschneiden der jeweiligen Konfidenzintervalle gekennzeichnet ($P \leq 0,025$; HORN & ERDMANN, 1978).

5.2.2 Verdaulichkeitsversuch¹

Dieser Versuch diente neben der Überprüfung des Einflusses von Arsen auf die Verdaulichkeit der Rohnährstoffe des Futters auch der quantitativen Erfassung der Arsenausscheidung über Kot und Harn. Letzteres diente der Gegenüberstellung des aufgenommenen und ausgeschiedenen Arsenmenge im Zeitraum der Untersuchung der Verdaulichkeit. Die Durchführung des Verdaulichkeitsversuches erfolgte in Anlehnung an die Methode zur standardisierten Verdaulichkeitsbestimmung laut AfBN (1991).

¹ zuerst veröffentlicht von Boguhn *et al.* (2007)

5.2.2.1 Versuchsration

Es wurden 6 Versuchsvarianten getestet: Die Ration (Angaben in Originalsubstanz) bestand entweder aus 1600 g Grassilage (vom Versuchsfeld des Institutes für Agrar- und Ernährungswissenschaften, siliert in Rundballen, geringer Luzerneanteil) oder 2500 g Grünfutter (2. Schnitt, extensives Grünland) oder 800 g Heu (1. Schnitt im Stadium Anfang Blüte, intensiv geführtes Grünland eines brandenburgischen Landwirtschaftsbetriebes), jeweils mit oder ohne Zusatz von arsenhaltiger Erde (Tab. A4). Es handelte sich hierbei um die gleiche Erde, die bereits im HFT eingesetzt wurde (167 mg As/kg Originalsubstanz).

In Vorbereitung auf die jeweiligen Versuche wurden die Futtermittel in Höhe der halben Versuchsration in Folienbeutel eingewogen. Währenddessen wurden repräsentative Proben für die Analyse gewonnen. Bis zur Verwendung des Futters erfolgte eine Tiefkühlagerung bei -18 °C mit Ausnahme der Heuration (Lagerung bei Raumtemperatur). Die Höhe der Erdzulagen (40, 30 bzw. 35 g pro Tier und Mahlzeit) für die Varianten mit Grassilage, Grünfutter und Heu folgte der angestrebten Arsenkonzentration von ca. 17 mg As/kg T der Ration.

Die Futtevorlage erfolgte täglich um 7⁰⁰ und 14⁰⁰ Uhr. Für eine bessere Haftung der Erde am Futtermittel und zur Vorbeugung einer Entmischung durch die Tiere wurden die Grasprodukte angefeuchtet. Besonders bei der Grassilage und dem Heu wurden dennoch größere Mengen an Erde selektiert und folglich nicht verzehrt.

Zur morgendlichen Fütterung wurden zusätzlich 10 g einer Mineralstoffmischung für Schafe (BASU-Mineralfutter für Schafe, Rezept Nr.: 9501, Themar; Tab. A2) verabreicht. Tränkwasser stand zur freien Verfügung. Futterreste wurden in der Sammelperiode tierindividuell erfasst und bis zur weiteren Aufbereitung (Trocknung bei 65 °C über 24 h, Vermahlung) bei -18 °C gelagert. In der Weender Rohnährstoffanalyse wurde der Gehalt an Rohprotein, -fett und -faser im Futter, in den Futterresten und im Kot ermittelt und diente der Berechnung der Verdaulichkeiten.

5.2.2.2 Versuchsaufbau

Pro Versuchsvariante wurden 4 Hammel der Rasse Rauhwolliges Pommersches Landschaf im Nutztierwissenschaftlichen Zentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Merbitz in Einzelbuchten mit einer Grundfläche von 1,0 m x 1,5 m aufgestellt. Zu

Versuchsbeginn und -ende wurden die Lebendmassen der Tiere erfasst, um zu bestätigen, dass die Energiemenge des Futters den Erhaltungsbedarf der Tiere nicht überstieg. Nach einer 17-, 16- bzw., 14-tägigen Phase zur Anpassung an die Ration (für Grassilage, Grünfutter bzw. Heu) folgte eine 6-tägige Sammelperiode. In dieser Zeit wurden die Hammel einzeln in Bilanzkäfige mit einer Grundfläche von 1,5 m x 0,7 m eingestallt und mit einer Kette am Halsband fixiert, die jedoch das Aufstehen und Hinlegen der Tiere ermöglichte. Für eine tierindividuelle quantitative Sammlung des Kotes wurden Geschirre mit Kotbeutel am Tier angepasst. Der Harn wurde durch den Gitterboden der Käfige in einer Rinne abgeleitet, gesammelt und mengenmäßig erfasst. In der Sammelphase wurde täglich vor der morgendlichen Fütterung der Kotbeutel jedes Tieres geleert, der Kot gewogen, 10 % der Menge als Probe entnommen und bei -18 °C gelagert. Ebenso wurde das Harnvolumen gemessen und 2,5 % des Volumens als Probe bei -18 °C aufbewahrt. Somit konnte eine tierindividuelle Sammelprobe von Kot und Harn über 6 Tage erstellt werden.

Der Kot wurde in Vorbereitung auf die Weender Roh Nährstoffanalyse und der Ermittlung der Arsenkonzentration über 24 h bei 65 °C getrocknet und auf 1 mm Siebdurchgang (für die Arsenanalyse 0,5 mm) vermahlen.

5.2.2.3 Berechnung der Roh Nährstoffverdaulichkeit und der Umsetzbaren Energie

Die Verdaulichkeit ist definiert als Differenz zwischen der mit dem Futter aufgenommenen („Input“) und mit dem Kot ausgeschiedenen Menge („Output“) des jeweiligen Nährstoffs, in Relation zur aufgenommenen Nährstoffmenge (Gl. 4). Dabei wurde der „Input“ um die Roh Nährstoffmenge aus den Futterresten korrigiert.

$$\text{Verdaulichkeit}_{\text{Roh Nährstoff}} = \frac{\text{Roh Nährstoff}_{\text{Input}} - \text{Roh Nährstoff}_{\text{Output}}}{\text{Roh Nährstoff}_{\text{Input}}} \cdot 100 \% \quad (4)$$

Verdaulichkeit (%)
Angabe der Roh Nährstoffe in g/d

Die Umsetzbare Energie wurde errechnet aus dem verdaulichen Rohfett, der verdaulichen Rohfaser und dem verdaulichen Rest nach den Vorgaben der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (Gl. 5; GfE, 2001). Der verdauliche Rest errechnete sich aus der

verdaulichen organischen Substanz abzüglich des verdaulichen Rohfettes und der verdaulichen Rohfaser.

$$ME \text{ (MJ)} = 0,0312 \cdot DXL + 0,0136 \cdot DXF + 0,0147 \cdot (\text{DOS-DXL-DXF}) + 0,00234 \cdot XP \quad (5)$$

DXL – verdauliches Rohfett in g, DXF – verdauliche Rohfaser in g, DOS – verdauliche organische Substanz in g

5.2.2.4 Arsenausscheidung

Zur Gegenüberstellung der Arsenaufnahme und -ausscheidung wurden zum Einen die Arsenkonzentrationen in den Sammelproben von Harn und Kot analysiert, zum Anderen auch der Arsengehalt des Futters, korrigiert um die Arsenmenge in den Futterresten. Aus der täglichen Aufnahme und Ausscheidung von Arsen wurde tierindividuell die Differenz errechnet.

5.2.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SAS für Windows (Version 9.1) unter Verwendung der Prozedur *glm*. Mittels eines t-Tests wurden zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede im Mittelwertsvergleich der berechneten Verdaulichkeiten bei einem Signifikanzniveau $P \leq 0,05$ gesichert.

5.3 Einsatz synthetischer Arsenverbindungen

5.3.1 Arsenverbindungen

Zur Nachahmung einer Arsenkontamination des Futters wurden 2 Arsenverbindungen eingesetzt: Dinatriumhydrogenarsenat-Heptahydrat ($\text{HNa}_2\text{AsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Fa. Omikron GmbH, Neckarwestheim; im Folgenden als Na-Arsenat bezeichnet) und Diarsentrioxid (As_2O_3 ; Fa. Omikron GmbH, Neckarwestheim; im Folgenden als Arsentrioxid bezeichnet). Im Na-Arsenat liegt das Arsen in der 5-wertigen Form vor, im Arsentrioxid ist es 3-wertig. Die Höhe der Einwaage der jeweiligen Arsenverbindung wurde so kalkuliert, dass die angestrebte Konzentration an reinem Arsen, bezogen auf die Trockensubstanz des Futtermittels, erreicht wurde.

5.3.2 Verwendete Futtermittel

Als Substrat wurde eine Grassilage (4. Schnitt 2005; geringer Kräuteranteil) mit folgender Rohstoffzusammensetzung eingesetzt (g/kg T): Rohprotein 218, Rohfaser 241 und Rohfett 40 bei einer Trockensubstanz von 355 g/kg Frischmasse. Die Trocknung und Vermahlung erfolgte wie im Versuch 5.2.

5.3.3 Gasbildung

Die Vorbereitung der Kolbenprober, der Ansatz des Inkubationsmediums, die Durchführung und die mathematisch-statistische Auswertung erfolgten wie in Versuch 5.2.1 mit folgenden Abänderungen: 1. Das Inkubationsmedium wurde nicht mit destilliertem Wasser verdünnt, 2. pro Durchgang wurden 4 Blindproben mitgeführt und 3. die Kolben wurden nach 7, 15 und 29 h entgast.

5.3.3.1 Varianten

Na-Arsenat oder Arsen trioxid wurde in die Grassilage eingemischt, mit dem Ziel, Arsenkonzentrationen von 2, 5, 10, 20 oder 50 mg As/kg T zu erreichen. Die Verbindungen wurden variantenabhängig in der entsprechenden Menge in etwas destilliertem Wasser gelöst und jeweils einem kleinen Teil von insgesamt 20 g, bei 65 °C getrockneter (94,2 % T) und vermahlener Grassilage beigemischt (Tab. A5). Eine Trocknung dieser Aufschlämmung fand im Umlufttrockenschrank bei 65 °C statt. Die Vormischung wurde dann für jede Variante mit dem restlichen Teil der Grassilage zur endgültigen Einstellung der Arsenkonzentration vereinigt.

Die angestrebten Arsenkonzentrationen durch Zugabe von Arsen trioxid wurden nicht erreicht. Die Konzentrationsstufen des Arsens bei der Zugabe von Na-Arsenat sind jedoch deutlich erkennbar (Tab. 4). Der natürliche Arsengehalt der Grassilage lag bei 0,22 mg As/kg T.

Tabelle 4: Angestrebter und analysierter Arsengehalt (mg As/kg T) in der Grassilage nach Zusatz von Arsen trioxid (As^{III}) und Na-Arsenat (As^V)

angestrebter Arsengehalt	analysierter Arsengehalt	
	As ^{III}	As ^V
0	0,22 ⁺	
2	0,45	2,28
5	0,56	3,45
10	0,72	8,01
20	1,54	16,77
50	5,00	47,98

⁺ natürlicher Arsengehalt der Grassilage

5.3.4 Pansensimulation

Mit dem als Rusitec bezeichneten semi-kontinuierlichen System zur Nachahmung der Nährstofffermentation im Pansen kann zum Einen der Abbau verschiedener Rohnährstoffe ermittelt werden (CZERKAWSKI & BRECKENRIDGE, 1977) und zum Anderen ist es möglich, qualitative und quantitative Aussagen zur mikrobiellen Proteinsynthese zu treffen.

5.3.4.1 Varianten

Aufgrund der begrenzten Kapazitäten wurden je Arsenverbindung 2 verschiedene Dosierungen an Arsen getestet: 5 und 20 mg As/kg T (neben einer Kontrollvariante). Als Futtermittel diente wiederum die Grassilage (siehe 5.3.2). Für einen Versuchsdurchgang mit einer Dauer von 14 Tagen wurden je Variante 13 Futterbeutel mit 15 g bei 65 °C getrockneter Grassilage (91,2 % T) befüllt und mit Drahtbindern verschlossen. Um die angestrebte Arsenkonzentration im Futter zu gewährleisten, erfolgte der Zusatz der entsprechenden Menge und Art der Arsenverbindung für jeden Futterbeutel separat (Tab. A6). In 3 unabhängigen Versuchsdurchgängen wurden die 5 Varianten jeweils einzeln getestet, sodass insgesamt 3 Wiederholungen für die Auswertung zur Verfügung standen.

5.3.4.2 Markereinsatz (^{15}N)

Zur quantitativen Ermittlung der mikrobiellen Proteinsynthese *in vitro* war die Verwendung eines Markers notwendig. In diesem Versuch wurde das Stickstoffisotop ^{15}N eingesetzt, welches über Ammoniumchlorid (analysierte ^{15}N -Konzentration 11,5 % des Gesamtstickstoffgehaltes) über den gesamten Versuchszeitraum kontinuierlich mit der Pufferlösung dem System zugeführt wurde (Tab. A7). Die kontinuierliche Zufuhr ist Voraussetzung, um ein Gleichgewicht zwischen Aufnahme und Abgabe von ^{15}N durch die Mikroben zu gewährleisten. Dann ist die maximale Anreicherung von ^{15}N in den Mikroben erreicht.

In der Umwelt kommt dieses Isotop nur in sehr geringen Mengen vor und wird von den Mikroben ohne Unterschied zum ^{14}N -Ammoniumstickstoff in das Protein eingebaut. Daher eignet sich dieses gut als Marker für die mikrobielle Proteinsynthese. Die Funktion der Salze im Puffer entsprach der Aufgabe des Speichels der Wiederkäuer, einer pH-Wert-Absenkung durch die gebildeten kurzkettigen Fettsäuren im Fermenter entgegenzuwirken.

5.3.4.3 Aufbau des Systems

Die Inkubation des Versuchsfutters fand in Fermentationsgefäßen mit einem Durchmesser von 8 cm und einem Volumen von 800 ml statt, die in einem auf 39 °C temperierten Wasserbecken standen (Abb. 4). Diese Fermenter waren aus Plexiglas angefertigt und enthielten einen weiteren, verschraubbaren Innenbehälter, in dem jeweils zwei Futterbeutel (50 x 100 mm; Nylonsiebgewebe; Porengröße 100 µm; Fa. Linker Industrie Technik GmbH, Kassel) inkubiert wurden. Eine regelmäßige Anordnung von Löchern (Ø 9 mm) im Boden und Deckel des Innenbehälters ermöglichte, dass die Futterbeutel vom Inkubationsmedium durchströmt werden konnten. Ein Schraubdeckel, verbunden mit einem Gestänge, verschloss den Innenbehälter. Der oberen Abdeckung des Fermenters diente eine dem Durchmesser angepasste Scheibe mit Gummidichtung und Anschlussmöglichkeit für einen Schlauch zur Ableitung des Flüssigkeitsüberschusses aus dem Fermenter. Durch ein Loch in der Mitte dieser Abdeckung wurde das mit dem Innenbehälter verbundene Gestänge nach außen geführt. Ein aufgesetzter Schraubring verschloss den Fermenter. Daneben befand sich an dessen Boden eine weitere Zugangsöffnung, über die kontinuierlich die Pufferlösung mittels einer Dosierpumpe (Ole

dich Instrumentmakers ApS, Hvidovre, Dänemark; Kapazität für 8 Schläuche) in den Fermenter geleitet wurde.

Durch die ständige Zufuhr von Pufferlösung entstand im Fermenter ein Flüssigkeitsüberschuss, der über den Schlauch an der Abdeckung abgeführt wurde. Die Flüssigkeit, im Weiteren als Überlauf bezeichnet, wurde in einem Erlenmeyerkolben gesammelt und bis zur Entnahme im 4 °C kalten Wasserbad gekühlt. Die Temperatur des Kühlwassers und dessen stetiger Fluss wurden durch ein Kälteumwälzthermostat (Julabo, Typ ED, Seelbach) aufrecht erhalten.

Die Gestänge der einzelnen Fermenter waren mit einer Hubvorrichtung verbunden, die von einem Motor angetrieben wurde. Dieser bewegte den Innenbehälter inklusive Futterbeutel mit einer Frequenz von 10 bis 12 Hüben min^{-1} ständig auf und ab und sorgte somit für einen stetigen Strom im Inneren des Fermenters.

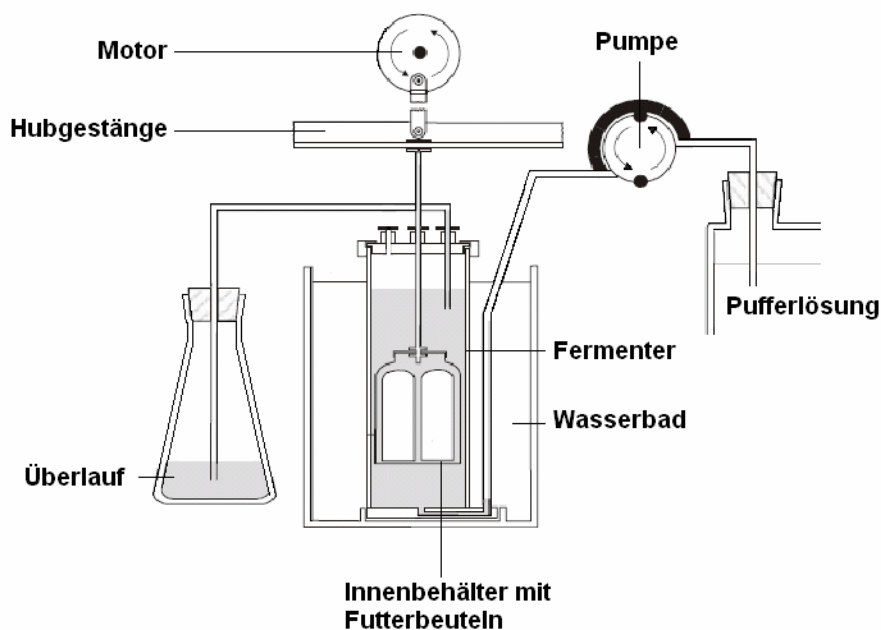


Abbildung 4: Aufbau des Rusitec-Systems (nach JASPER, 2000)

5.3.4.4 Durchführung

Am Tag des Versuchsbeginns wurde flüssige und feste Phase aus dem Pansen der fistulierten Schafe entnommen (siehe Kapitel 5.1).

Jeder Innenbehälter eines Fermenters wurde mit einem Futterbeutel der entsprechenden Variante gefüllt und zusätzlich mit einem weiteren, der ca. 60 g frisch gewonnene feste

Phase des Panseninhaltes enthielt. Dadurch sollten Mikroben, die vorwiegend Partikel-assoziiert vorkommen, mit in das System eingebracht werden.

Die Fermenter wurden mit einem Gemisch aus gleichen Anteilen Pansensaft und Puffer (ohne ^{15}N -Anreicherung) aufgefüllt, das Innengefäß mit den Futterbeuteln eingesetzt und der Fermenter verschlossen. Anschließend wurden die Fermenter im Wasserbecken positioniert, fixiert und mit dem Hubgestänge verbunden.

Täglich wurde ein Futterbeutel jedes Fermenters durch einen neuen ausgetauscht, sodass jeder Beutel für 48 h im System verblieb, mit Ausnahme des zu Versuchsbeginn eingesetzten Beutels mit der festen Phase. Dieser wurde bereits nach 24 h durch einen der Variante entsprechenden Futterbeutel ersetzt.

Der entnommene Beutel wurde in 70 ml vorgewärmter Pufferlösung gewaschen und mit mäßiger Kraft ausgedrückt. Durch diese Prozedur sollten Futterpartikel-assoziierte Mikroben abgelöst werden. Die Spülflüssigkeit wurde dem Fermenter wieder zugeführt. Versuchsbegleitend wurden täglich die pH-Werte in den Fermentern und die Temperatur im Wasserbecken überprüft. Die Kolben mit den Überläufen wurden täglich gegen leere Kolben ausgetauscht und die Menge des Überlaufes mittels Wägung ermittelt.

Die ersten 7 Versuchstage dienten der Adaptation an das zu untersuchende Futter und dem Erreichen einer stabilen Situation in der Anreicherung von ^{15}N des gesamten N-Pools. In einer anschließenden Sammelphase von 7 aufeinander folgenden Tagen wurden Proben von Futterresten und Überlauf genommen.

Nach dem Ausdrücken der Futterbeutel wurden diese inklusive Inhalt (Futterreste) bei 65 °C für 24 h im Trockenschrank getrocknet und für weitere 24 h an der Luft abgekühlt. Danach wurden die Futterreste aus den Beuteln zurückgewogen und für jede Variante in einer Sammelprobe über 7 Tage vereinigt. In dieser Mischprobe erfolgte dann die Analyse der Weender Rohnährstoffe (nach Vermahlung des Materials auf 1 mm Siebdurchgang) und des Gehaltes an ^{15}N (nach Vermahlung des Materials auf 0,5 mm Siebdurchgang).

Die täglichen Überläufe wurden bis zur Verarbeitung bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. 320 ml der homogenisierten Suspension wurden auf 8 Zentrifugenröhrchen (Herolab GmbH, 50 ml, Wiesloch) aufgeteilt, welche dann für 5 min mit 2000 g bei 4 °C zentrifugiert wurden (Heraeus Sepatech Suprafuge 22, Osterode). Dies diente der Abtrennung grober Futterpartikel. Die Überstände aus den 8 Zentrifugenröhrchen wurden unter vorsichtiger Zurückhaltung der abzentrifugierten Partikel in einem sauberen Gefäß vereinigt und bis zur Weiterbehandlung bei -18 °C gelagert. Dadurch konnten nach dem Auftauvorgang in einem zweiten Vorzentrifugationsschritt bei gleicher Zeit und

Beschleunigung noch effektiver Futterpartikel abgetrennt werden (BRANDT & ROHR, 1981). Die Überstände wurden mit einer Saugkolben-Messpipette (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt) vorsichtig entnommen und in weitere 8 Zentrifugenröhrchen überführt. Die anschließenden Zentrifugationsschritte dienten der Gewinnung der Referenzmikroben.

5.3.4.5 Gewinnung der Referenzmikroben

Durch eine weitere Zentrifugation (15 min, 27000 g, 4 °C) wurde die Mikrobenmasse abgeschieden. Vom Überstand wurden 10 ml für die Messung der Arsenkonzentration und 30 ml für die Ermittlung der ¹⁵N-Konzentration abgenommen und bei -18 °C (als Sammelprobe über 7 Tage) gelagert. Nach Abgießen des restlichen Überstandes wurde das abgeschiedene Mikrobenpellet mit 10 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung zum „Waschen“ resuspendiert. Es wurden die Inhalte von je zwei Zentrifugenröhrchen vereinigt und in einem weiteren Schritt (15 min, 27000 g, 4 °C) erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Mikrobenpellet in 10 ml 0,9 %iger NaCl resuspendiert und ein weiteres Mal unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Pellets aus Mikroben für 10 min bei -18 °C eingefroren, damit sie nachfolgend mit einem Spatel entnommen werden konnten. Alle Referenzmikroben einer Versuchsvariante wurden pro Versuchstag vereint und bis zur Weiterverarbeitung (Gefriertrocknung, Mörsern zu einem Pulver) bei -18 °C gelagert. In den Mikroben wurden dann als Sammelprobe über die 7 Tage die Gehalte an N, ¹⁵N, sowie Aminosäuren analysiert. Aliquote aus den Überlaufproben wurden gefriergetrocknet und fein gemörsert. In diesen wurde ebenfalls die ¹⁵N-Konzentration gemessen.

5.3.4.6 Berechnung des Abbaus der Rohnährstoffe

In der Weender Rohnährstoffanalyse wurden die Rohnährstoffe der verwendeten Grassilage und der Futterreste analysiert. Als abgebauter Anteil wurde die Menge bezeichnet, die als Differenz zwischen zu- und abgeführtem Rohnährstoff auftrat, ausgedrückt als prozentualer Anteil (Gl. 4). An den Futterresten anhaftende Mikroben blieben hierbei unberücksichtigt.

5.3.4.7 Berechnung der Effizienz

Durch die Ermittlung des mittleren täglichen In- und Outputs an ^{15}N (über 7 Tage) konnte eine Bilanzierung durchgeführt werden. Der Input setzte sich zusammen aus der ^{15}N -Menge, die einerseits täglich mit der Pufferlösung und andererseits mit dem Futter zugeführt wurde. Im Output wurde diejenige Menge an ^{15}N zusammengefasst, die täglich mit dem Überlauf und den Futterresten aus dem System abgeführt wurde. Die Differenz stellt diejenige Menge an ^{15}N dar, die täglich in das Mikrobenprotein eingebaut worden ist. Über die Messung des Anteils von ^{15}N am Gesamt-N-Gehalt in den Referenzmikroben konnte deren absoluter N-Gehalt berechnet werden und daraus wiederum die Menge an gebildetem mikrobiellem Rohprotein (Gl. 6), welche auf die abgebaute organische Substanz bezogen wurde. Dies bezeichnet die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese.

$$\text{MP} = \frac{(^{15}\text{N}_{\text{Futter}} + ^{15}\text{N}_{\text{Puffer}}) - (^{15}\text{N}_{\text{Futterreste}} + ^{15}\text{N}_{\text{mikrobenfreier Überlauf}})}{^{15}\text{N}_{\text{Mikroben}}} \cdot 6,25 \quad (6)$$

MP – Menge an gebildetem mikrobiellen Rohprotein (g/d)

6,25 – Umrechnungsfaktor von Stickstoff in Rohprotein

$^{15}\text{N}_{\text{Mikroben}}$ – ($\mu\text{g}^{15}\text{N}/\text{mg N}$) mittlerer ^{15}N -Gehalt in den Referenzmikroben (d 7 bis 14)

$^{15}\text{N}_{\text{Futter, Puffer, Futterreste, mikrobenfreier Überlauf}}$ – ($\mu\text{g}/\text{d}$) ^{15}N -Menge der entsprechenden Proben (Tag 7 bis 14)

5.3.4.8 Statistische Auswertung

Mit Hilfe des Programmes SAS für Windows (Version 9.1) und mittels der Prozedur *glm* erfolgte die statistische Auswertung. Signifikante Unterschiede zwischen den Varianten wurden im Mittelwertsvergleich mittels eines t-Tests bei einem Signifikanzniveau $P \leq 0,05$ ermittelt.

5.4 Analysen

5.4.1 Weender Rohnährstoffe

Alle Rohnährstoffanalysen der Futtermittel und im Kot wurden im institutseigenen Labor durchgeführt und erfolgten nach den Standardmethoden des VDLUFA (NAUMANN & BASSLER, 1976).

5.4.2 Detergenzienfaser

Die Bestimmung der sauren Detergenzienfaser (ADF) und neutralen Detergenzienfaser (NDF) in der Grassilage wurde nach den Vorschriften des VDLUFA (6.5.1 bzw. 6.5.2; NAUMANN & BASSLER, 1988), basierend auf den von VAN SOEST (1963) beschriebenen Methoden, im institutseigenen Labor durchgeführt.

5.4.3 ^{14}N , ^{15}N und Gesamt-N

Der ^{14}N - und ^{15}N -Gehalt in den Referenzmikroben, Futterresten, der Grassilage, im Ammoniumchlorid und im Überlauf wurde mit einem Elementaranalysator (EuroVector, HEKAtech GmbH, Wegberg) bestimmt, der mit einem Isotopen-Massenspektrometer (Delta V Advantage, ThermoScientific GmbH, Bremen) gekoppelt war. Die Einwaage der Proben erfolgte in Zinntiegel, die anschließend verschlossen wurden. Die Einwaagehöhe orientierte sich an der angestrebten Signalgröße und lag bei geschätzten N-Mengen zwischen 50 und 100 μg . Die bei der Verbrennung (1000 °C unter Sauerstoffzufuhr) der Probe entstehenden Oxidationsprodukte (hier N_2) wurden ionisiert und aufgrund der unterschiedlichen Molekülmassen (28, 29 und 30) im Magnetfeld getrennt. Der prozentuale ^{15}N -Gehalt in der Probe (neben dem ^{14}N -Gehalt) ergab sich aus dem Flächenverhältnis der Massen 28 (^{14}N , ^{14}N) und 29 (^{14}N , ^{15}N ; hier nur 50 % der Fläche), sowie der Massen 29 (^{14}N , ^{15}N ; wiederum nur 50 % der Fläche) und 30 (^{15}N , ^{15}N). Jede Probe wurde in 3-facher Wiederholung gemessen und in Abhängigkeit der Probenmatrizes eine maximale Standardabweichung von 3 bis 5 % zugelassen.

Da die Peakflächen linear mit der Stickstoffmenge in der jeweiligen Probe steigen, kann anhand der Einwaagehöhe die N-Konzentration der einzelnen Proben bestimmt werden. Zur Erstellung einer dementsprechenden Kalibrationsgeraden wurde Acetanilid in unterschiedlichen Konzentrationen im Messbereich der jeweiligen Proben verwendet.

5.4.4 Aminosäuren

Die Ermittlung der Aminosäuregehalte des Mikrobenproteins erfolgte in Anlehnung an die VDLUFA-Methode 4.11.1 (NAUMANN *et al.*, 2004) für Futtermittel nach Angaben von RODEHUTSCORD *et al.* (2004). Dabei wird die Probe durch vorangegangene Oxidations-

und Hydrolysevorgänge aufgeschlossen und im nachfolgenden können Aminosäuren durch Ninhydrin-Reagenz aufgetrennt und in einem Aminosäuren-Analysator analysiert werden. Mit Ausnahme der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Histidin wurden alle Aminosäuren mittels Ionenaustausch-Chromatographie (Amino Acid Analyzer LC 3000, Eppendorf Biotronik, Gründau) erfasst. Die Angabe der Aminosäuren erfolgte in g/16 g N.

5.4.5 Arsen

Die Proben (Futtermittel, Futterreste, Kot, Harn, Erde, Überläufe) wurden im Labor der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Bereich Landwirtschaftliches Untersuchungswesen in 04159 Leipzig aufgeschlossen und analysiert. Der Aufschluss erfolgte gemäß der VDLUFA-Methode 2.1.3 (BASSLER, 2007) mittels mikrowellengestütztem Druckaufschluss, und die Arsenanalyse erfolgte mit einem Quadrupol-Massenspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS; Elan 6000, Perkin Elmer, Waltham, USA).

6 In vitro-Studien: Ergebnisse

6.1 Einsatz arsenhaltiger Erde

6.1.1 Gasbildung

Die Kurvenverläufe der kumulativen Gasbildung variierten in Abhängigkeit des Konzentratanteils im Futter (Abb. 5). Für die Grassilage ohne Konzentrat wurde ein Gasbildungspotenzial von ca. 38 ml Gas/200 mg T, ausgedrückt als Plateau der Funktion, geschätzt. Dabei hatte eine hohe oder geringe Arsenkonzentration in der zugesetzten Erde keinen Einfluss. Bei einer Zulage von 20 % Konzentrat war das Gasbildungspotenzial im Mittel um 4 ml höher gegenüber der Variante ohne Konzentratzusatz (Tab. 5). Ein Gehalt von 30 % Konzentratfutter in der Grassilage führte nur zu einem geringfügig höheren geschätzten Gasbildungspotenzial als ein Gehalt von 20 % Konzentrat.

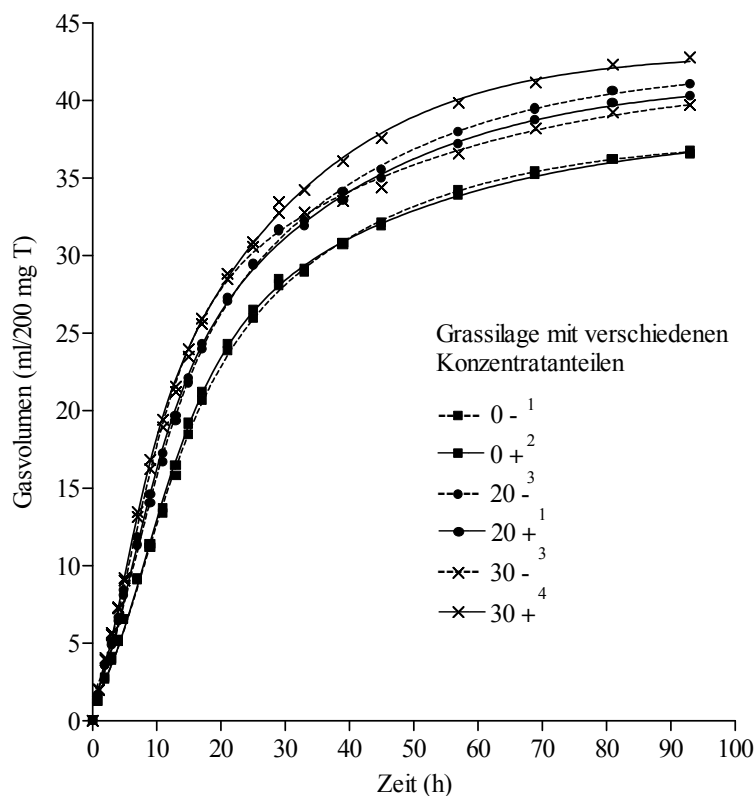


Abbildung 5: Kumulative Gasbildung über 93 h bei der Fermentation einer Grassilage mit unterschiedlichen Konzentratanteilen (0, 20 und 30 %) und einer Zulage von Erde mit geringem (-) oder hohem (+) Arsengehalt

¹ n=9; ² n=12; ³ n=11; ⁴ n=8

Die Zulage der arsenhaltigen Erde hatte innerhalb einer Zulagestufe an Konzentrat keinen signifikanten Einfluss auf das Gasbildungspotenzial.

Die maximale Gasbildungsrate und der Zeitpunkt des Erreichens des Wendepunktes der Funktion variierten ebenfalls in Abhängigkeit vom Konzentratanteil (Tab. 5). Die Zulage von arsenkontaminierter Erde in der Variante mit 30 % Konzentrat bewirkte eine um 0,2 ml höhere maximale Gasbildungsrate und einen früheren Eintritt des Wendepunktes um 1,1 h gegenüber der Variante mit arsenarmer Erde. Allgemein trat der Wendepunkt mit steigender Konzentratzulage zunehmend früher ein. In der Grassilage-Variante ohne Konzentrat wurde er nach 7,8 und 8 h erreicht, bei der Zulage von 30 % Konzentrat in der Grassilage 2 bis 3 h früher. In der Variante ohne Konzentrat war die maximale Gasbildungsrate mit 1,4 ml/h erwartungsgemäß am geringsten und stieg mit der Höhe des Konzentratanteils bis 2,1 ml/h an.

Tabelle 5: Geschätztes Gasbildungspotenzial (*b*), maximale Gasbildungsrate (Gb_{\max}) und Zeitpunkt des Erreichens ($t_{\text{Wendepunkt}}$) bei der Inkubation einer Grassilage mit unterschiedlichen Konzentratanteilen (0, 20 und 30 % der T) und dem Zusatz von Erde mit einem geringen (-) oder hohen (+) Arsengehalt

Variante		<i>b</i>	Gb_{\max}	$t_{\text{Wendepunkt}}$
Konzentrat	Erde	(ml/200 mg T)	(ml/h)	(h)
0	- ¹	37,5 ^a	1,4	7,8
0	+ ²	38,2 ^{ab}	1,4	8,0
20	- ³	42,2 ^c	1,7	6,5
20	+ ¹	41,4 ^{bc}	1,7	6,2
30	- ³	41,5 ^{abc}	1,9	6,0
30	+ ⁴	43,1 ^c	2,1	4,9

^{a,b} unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Varianten ($P \leq 0,025$; gekennzeichnet durch ein Nichtüberschneiden der Konfidenzintervalle)

¹ n=9; ² n=12; ³ n=11; ⁴ n=8

6.1.2 Verdaulichkeitsversuch

6.1.2.1 Verdaulichkeit der Rohnährstoffe

Die Verdaulichkeit der organischen Substanz in der Grassilage war bei der Zulage arsenhaltiger Erde mit 54,2 % um mehr als 4 %-Punkte geringer als in der Grassilage ohne

den Zusatz von Erde (Tab. 6). Ein Grund für diese Differenz ist die um 8 %-Punkte geringere Verdaulichkeit der Rohfaser in der Gruppe mit der Erdzulage gegenüber der Kontrolle. Die Verdaulichkeit des Rohfettes und des Rohproteins der Grassilage unterschieden sich nicht zwischen den Varianten.

Tabelle 6: Verdaulichkeit der Rohnährstoffe und abgeleitete Energiekonzentrationen in einer Grassilage, in Grünfutter und in einem Heu ohne („Kontrolle“) oder mit („Erde“) Zusatz einer arsenhaltigen Erde (Mittelwert und Standardabweichung; n=4)

Gruppe	OS	XP	XL	XF	ME
			(%)		(MJ/kg T)
<i>Grassilage</i>					
Kontrolle	58,5 ^a 1,26	60,0 1,57	8,2 8,99	56,8 ^a 2,00	7,6 0,17
Erde ¹	54,2 ^b 2,16	58,6 1,41	10,6 0,57	48,7 ^b 2,45	6,5 0,24
<i>Grünfutter</i>					
Kontrolle	56,8 1,58	61,4 ^a 2,67	46,0 11,7	54,8 3,05	7,4 0,2
Erde	58,2 1,5	52,4 ^b 1,23	0,0	58,8 3,29	6,2 0,15
<i>Heu</i>					
Kontrolle	63,2 1,16	66,7 ^a 0,86	30,8 ^a 4,01	64,5 2,37	8,9 0,15
Erde	62,5 0,38	61,5 ^b 1,80	13,3 ^b 6,12	64,1 2,13	8,4 0,04

OS – organische Substanz, XP – Rohprotein, XL – Rohfett, XF – Rohfaser, ME – Umsetzbare Energie

^{a,b} unterschiedliche Hochbuchstaben in einer Spalte innerhalb eines Grasproduktes kennzeichnen signifikante Differenzen zwischen den Varianten laut t-Test ($P \leq 0,05$)

¹ n=3

Ähnlich wie bei der Grassilage war mit 57 bis 58 % auch die Verdaulichkeit der organischen Substanz des Grünfutters (Tab. 6). Signifikante Unterschiede in den Verdaulichkeiten der Rohfaser und der organischen Substanz wurden nicht festgestellt. Die Verdaulichkeit des Rohproteins war in der Gruppe ohne Zusatz von Erde signifikant höher (61 vs. 51 %). Die errechnete Verdaulichkeit des Rohfettes lag in der Gruppe mit der Erdzulage ausnahmslos im negativen Bereich und wurde daher mit „0“ angenommen.

Grund dafür waren sehr geringe Fettgehalte in den Proben, die zu Messungenauigkeiten bei der Rohfett-Analyse führten. Die Konzentration an Umsetzbarer Energie war ähnlich gering wie bei der Grassilage (7,4 und 6,2 MJ/kg T).

Bei der Fütterung von Heu waren die Verdaulichkeiten des Rohproteins und des Rohfettes wiederum signifikant höher in der Gruppe ohne Zusatz von Erde (67 vs. 62 % bzw. 31 vs. 13 %; Tab. 6). Der Zusatz von Erde nahm keinen Einfluss auf die Verdaulichkeit der organischen Substanz und der Rohfaser.

Die Mengenangaben zu den Futterresten und Kot, sowie die analysierten Rohnährstoffgehalte können den Tabellen A8 bis A10 entnommen werden.

Es ist zu beachten, dass die Tiere während des Versuches die Erde stark selektierten, sodass die Tiere der Arsengruppe nicht die gesamte tägliche Futterration und Menge an Erde aufnahmen. Dies gilt insbesondere für die Varianten mit Grassilage und Heu.

6.1.2.2 Arsenausscheidung

Die im Futtermittel analysierten Arsenkonzentrationen für die Varianten mit dem Zusatz arsenhaltiger Erde wichen vor allem für das Heu stark von den kalkulierten Arsenkonzentrationen ab (Tab. A4). In der Gegenüberstellung der aufgenommenen und ausgeschiedenen Arsenmengen wurde mit den kalkulierten Werten gerechnet, da die Abweichungen vermutlich aus einer Entmischung der Futtermittel und der Erde bei der Probenaufbereitung für die Analyse resultierten. Die Berechnungen der Arsenaufnahme und -ausscheidung für die Varianten ohne Erde (Kontrollgruppe) erfolgten auf Basis der analysierten Arsenkonzentrationen.

In der Kontrollgruppe wurden in Abhängigkeit von der Grundration 0,2 bis 0,3 mg As/d aufgenommen, in der Gruppe mit dem Zusatz von Erde bis zu 8,2 mg As/d (Tab. 7).

Über den Kot wurde ein größerer Anteil an Arsen ausgeschieden als über den Harn, obwohl dieses Verhältnis in Abhängigkeit von der Futterquelle variierte (Tab. A11). Die Arsenausscheidung in der Gruppe mit der zugesetzten Erde lag erwartungsgemäß deutlich höher als bei den Hammeln der Kontrollgruppe. Die Differenz zwischen dem aufgenommenen und ausgeschiedenen Arsen nahm sowohl positive als auch negative Werte an und wies hohe Standardabweichungen auf. Es ist jedoch zu beachten, dass dies eine rein rechnerische Größe ist. Die Schwankungen resultieren vermutlich vorrangig aus Ungenauigkeiten bei der Erfassung des Verzehrs von Futter und Erde.

Tabelle 7: Arsenaufnahme und –ausscheidung bei der Vorlage von Grassilage, Grünfutter oder Heu ohne („Kontrolle“) oder mit („Erde“) Zusatz einer arsenhaltigen Erde (Mittelwert und Standardabweichung; n=4)

Gruppe	Aufnahme ¹	Ausscheidung		Differenz (Aufnahme - Ausscheidung)
		(mg As/d)		
		Harn	Kot	
<i>Grassilage</i>				
Kontrolle	0,29 0,005	0,07 0,007	0,17 0,007	0,05 13,575
Erde ²	1,98 3,646	1,31 0,653	1,90 0,975	-1,22 3,353
<i>Grünfutter</i>				
Kontrolle	0,28 0,082	0,04 0,006	0,22 0,045	0,01 0,041
Erde	5,50 3,378	1,12 0,292	4,55 0,918	-0,17 2,755
<i>Heu</i>				
Kontrolle	0,20 0,063	0,11 0,009	0,20 0,035	-0,10 0,051
Erde	8,20 2,899	4,36 1,630	6,59 2,026	-2,75 7,646

¹ Arsenmenge aus dem Futter korrigiert um die Arsenmenge aus den Futterresten

² n=3

6.2 Einsatz synthetischer Arsenverbindungen

6.2.1 Gasbildung

Die geschätzten Parameter und die Kurvenverläufe der kumulativen Gasbildung waren unabhängig von der Dosis und Art der zugelegten Arsenverbindung sehr ähnlich (Abb. 6). Das Gasbildungspotenzial der Varianten differierte zwischen 45,7 ml und 48,5 ml/200 mg T nur geringfügig (Tab. 8). Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle wurden für die Variante mit 50 mg As/kg T in Form von Arsentrioxid und in der Na-Arsenat-kontaminierten Variante mit 2 mg As/kg T festgestellt. Die Zulage von 2 und 20 mg As/kg T in Form von Arsentrioxid bedingte ein signifikant geringeres Gasbildungspotenzial als

die Zulage von 50 mg As/kg T in Form von Arsentrioxid. Weitere gesicherte Unterschiede zwischen den Varianten mit Arsentrioxid und Na-Arsenat können der Tabelle entnommen werden.

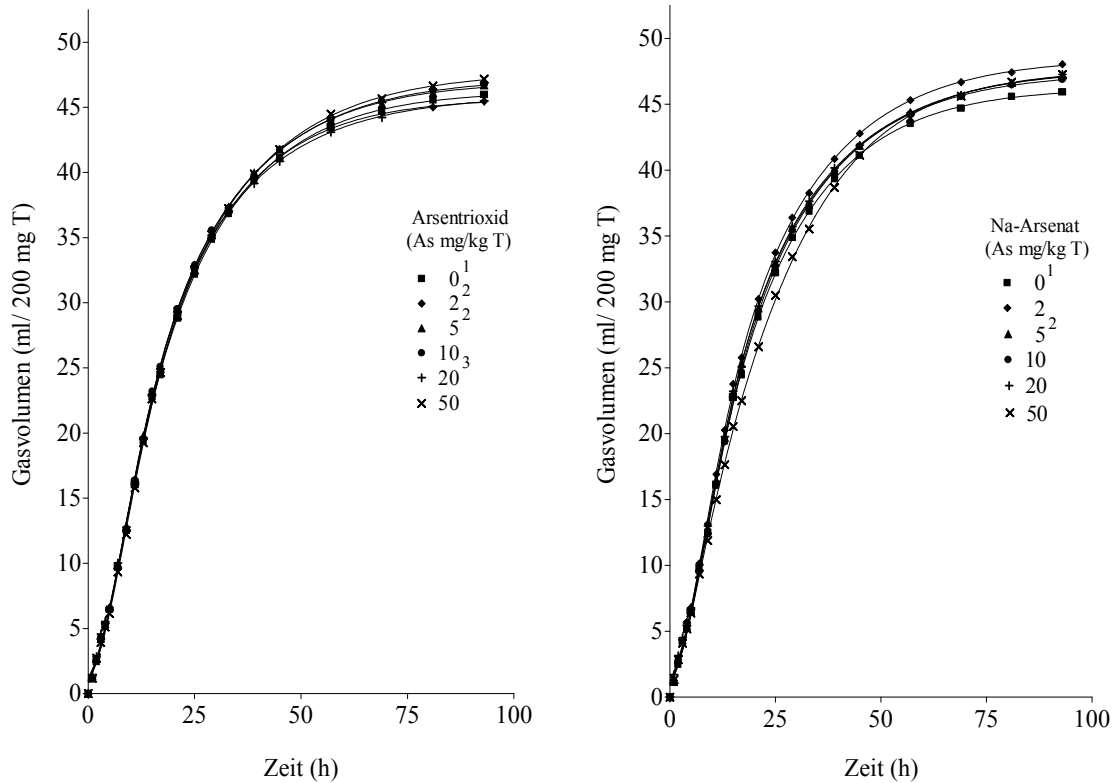


Abbildung 6: Kumulative Gasbildung über 93 h bei der Fermentation einer Grassilage mit Zusatz von Arsentrioxid oder Na-Arsenat in verschiedenen Konzentrationsstufen (n=8)

¹ n=6; ² n=7; ³ n=5

Die geschätzte maximale Gasbildungsrate lag mit Ausnahme der höchsten Na-Arsenat-Zulage bei 1,7 bis 1,8 ml/h und wurde am schnellsten in der Kontrollgruppe nach 8,1 h und mit steigender Arsentrioxid-Zulage mit zeitlicher Verzögerung erreicht. (An dieser Stelle sei nochmals darauf hingewiesen, dass der analysierte Arsengehalt in den Proben mit Arsentrioxid um den Faktor 10 geringer war, als ursprünglich kalkuliert.)

In der mit Na-Arsenat kontaminierten Grassilage mit 50 mg As/kg T wurde bereits nach 7,2 h eine maximale Gasbildungsrate von nur 1,5 ml/h geschätzt.

Tabelle 8: Geschätztes Gasbildungspotenzial (*b*), maximale Gasbildungsrate ($G_{b_{max}}$) und Zeitpunkt des Erreichens ($t_{Wendepunkt}$) bei der Inkubation einer Grassilage mit Zusatz von Arsentrioxid oder Na-Arsenat (in mg As/kg T) in verschiedenen Konzentrationsstufen ($n = 8$)

	Variante	<i>b</i> (ml/200 mg T)	$G_{b_{max}}$ (ml/h)	$t_{Wendepunkt}$ (h)
Arsentrioxid	0 ¹	46,2 ^{ab}	1,7	8,1
	2 ²	45,7 ^a	1,7	8,2
	5 ²	47,0 ^{abc}	1,7	8,3
	10	47,3 ^{abc}	1,8	8,4
	20 ³	45,9 ^{ab}	1,7	8,5
	50	47,7 ^c	1,7	8,7
Na-Arsenat	2	48,5 ^c	1,8	8,3
	5 ²	47,8 ^{bc}	1,8	8,5
	10	47,4 ^{bc}	1,7	8,6
	20	47,7 ^{bc}	1,7	8,6
	50	47,5 ^{bc}	1,5	7,2

^{a,b} unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Differenzen zwischen den Varianten ($P \leq 0,025$; gekennzeichnet durch ein Nichtüberschneiden der Konfidenzintervalle)

¹ n=6; ² n=7; ³ n=5

6.2.2 Pansensimulation

6.2.2.1 Abbau der Rohnährstoffe

Der Abbau der organischen Substanz lag im Mittel bei 41,1 % (Tab. 9). Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen den beiden Varianten (Arsentrioxid und Na-Arsenat) mit 20 mg As/kg T festgestellt. Der Zusatz von Arsentrioxid führte hier zu einem geringeren Abbau. Gegenüber der Kontrolle traten keine signifikanten Unterschiede auf. Der höhere Abbau der organischen Substanz beim Zusatz von Na-Arsenat resultierte aus dem höheren Abbau der Rohfaser und des Rohproteins gegenüber den anderen Varianten. Im Abbau des Rohproteins, der Rohfaser und der stickstofffreien Extraktstoffe konnten die numerischen Unterschiede zwischen den Varianten aufgrund der hohen Standardabweichungen statistisch nicht gesichert werden. Insbesondere die Spannweite der ermittelten Werte für

den Rohfaserabbau war sehr hoch (15,9 bis 25,1 %). Der Abbau des Rohproteins und der organischen Substanz war mit Zusatz von Arsentrioxid auf gleichem Niveau wie die Varianten ohne Arsen bzw. mit Na-Arsenat in der Dosierung von 5 mg As/kg T.

Tabelle 9: Abbau der Rohnährstoffe und Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese bei der Inkubation einer Grassilage mit dem Zusatz von Arsentrioxid oder Na-Arsenat in jeweils zwei Konzentrationsstufen (Mittelwert und Standardabweichung; n=3)

Variante (mg As/kg T)	Abbau				Effizienz (g mikrobielles Rohprotein/kg abgebaute OS)	
	OS	XP	XF	NfE		
	(%)					
Arsentrioxid	0	41,0 ^{ab}	49,9	20,5	53,3	360
		4,06	4,53	6,38	3,24	31
	5	40,1 ^{ab}	49,4	15,9	54,7	361
		2,34	3,9	8,56	2,84	21
	20	39,5 ^a	49,0	16,7	53,0	359
		1,82	4,04	5,83	3,54	5
Na-Arsenat	5	40,9 ^{ab}	49,6	20,9	53,0	336
		1,79	4,51	4,18	1,97	18
	20	44,2 ^b	52,8	25,1	56,0	336
		1,48	3,21	2,97	4,74	15

OS – organische Substanz, XP – Rohprotein, XF – Rohfaser, NfE – stickstofffreie Extraktstoffe

^{a,b} unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Differenzen zwischen den Varianten laut t-Test (P ≤ 0,05)

6.2.2.2 Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese

In der Kontrollgruppe und in den Varianten mit dem Zusatz von Arsentrioxid wurden im Mittel 360 g mikrobielles Rohprotein/kg abgebauter organischer Substanz gebildet (Tab. 9). Beide Stufen der Na-Arsenat-Zulage führten zu einer tendenziell geringeren mikrobiellen Rohproteinsynthese (336 g/kg abgebauter organischer Substanz), jedoch ohne signifikanten Unterschied.

6.2.2.3 Verbleib von Arsen

Der „Input“ an Arsen setzte sich kalkulatorisch aus dem natürlichen Arsengehalt der Grassilage (0,6 mg As/kg T) und der zugesetzten Verbindung (0, 5 oder 20 mg As/kg T)

unter Berücksichtigung der eingewogenen Futtermenge von 13,7 g T/d zusammen (Tab. 10, Tab. A12). Die Arsenmengen im Überlauf und in den Futterresten wurden unter „Output“ zusammengefasst. Die Differenz zwischen „Input“ und „Output“ bezeichnet diejenige Arsenmenge, die im Versuchssystem verblieben ist und wurde prozentual als „Wiederfindung“ ausgedrückt. In den Überläufen der Varianten mit 5 mg As/kg T sowie in der Kontrolle lag die Arsenkonzentration unter der Nachweisgrenze von 12 µg As/kg.

Der Überlauf der Versuchsvariante mit 20 mg As/kg T in Form von Arsentrioxid enthielt im Mittel 31 µg As/kg. In derselben Zulagehöhe mit Na-Arsenat wurde eine Arsenkonzentration von durchschnittlich 123 µg As/kg Überlauf analysiert.

Tabelle 10: Wiederfindung von Arsen im Pansensimulationssystem bei der Inkubation einer Grassilage mit Zusatz von Arsentrioxid oder Na-Arsenat in jeweils zwei Konzentrationsstufen (Mittelwert und Standardabweichung; n=3)

Variante (mg As/kg T)	Arsen- Input	Arsen-Output			Differenz	Wiederfindung (%)
		Ü	FR	gesamt		
		(µg As/d)				
0	8	n.n.	6 0,9	6 0,9	2	80
Arsentrioxid	5	n.n.	34 4,1	34 4,1	42	45
	20	281	16 6,2	154 170 2,7	111	61
Na-Arsenat	5	n.n.	40 10,5	40 10,5	36	53
	20	281	69 33,7	128 197 10,5	84	70

Ü – Überlauf; FR – Futterrest; n.n. – nicht nachweisbar

Der überwiegende Teil der zugesetzten Arsenmenge wurde in den Futterresten wiedergefunden. In der Kontrolle wurden 0,7 mg As/kg T analysiert, in den Varianten mit 5 und 20 mg As/kg T in Form von Arsentrioxid waren es je 4,1 und 18,1 mg As/kg T. In den Futterresten der Varianten 5 und 20 mg As/kg T im Futter mit der Na-Arsenat-Zulage wurden jeweils 4,9 und 16,1 mg As/kg T analysiert. Eine separate Messung der Arsenkonzentration in den Mikroben wurde nicht durchgeführt. Die Differenzen in der

Tabelle ergeben sich aus der Verrechnung der Menge an absolut zugeführtem Arsen („Input“) mit den mittleren täglich abgeführten Mengen an Arsen aus den Futterresten und aus dem Überlauf (zusammengefasst als „Output“) der entsprechenden Variante.

6.2.2.4 Aminosäuremuster

Es wurden keine signifikanten Unterschiede in den Aminosäuregehalten des mikrobiellen Rohproteins zwischen den Varianten festgestellt (Tab. A13). Histidin und Methionin waren die in den geringsten Mengen vorhandenen Aminosäuren (1,6 bzw. 2,2 g/16 g N. Glutamin und Asparagin waren mit 10,5 und 9,3 g/16 g N am häufigsten vertreten.

7 *In vitro*-Studien: Diskussion

7.1 Gasbildung

7.1.1 Zulage arsenhaltiger Erde

Das erhöhte Gasbildungspotenzial und auch die steigende maximale Gasbildungsrate mit zunehmendem Konzentratfutteranteil waren absehbar. Das Konzentrat als Quelle leicht fermentierbarer Kohlenhydrate war für die Mikroben gut verfügbar. Das frühere Erreichen des Wendepunktes mit steigendem Konzentratanteil lag unter anderem vermutlich am sinkenden Rohfaseranteil, der mit der Substitution der Grassilage durch leichter fermentierbares Konzentrat einherging. Es kann nicht differenziert werden, ob dieser Effekt auf das Konzentrat an sich zurückgeführt werden kann, oder ob hier durch die pH-Wert-Absenkung mehr Arsen für die Mikroben verfügbar war, was letztendlich zu diesem Effekt führte. Die verstärkte Bildung kurzkettiger Fettsäuren mit steigendem Konzentratanteil und ein damit einhergehender sinkender pH-Wert lagen dieser Überlegung zugrunde. Weiterhin schien die Erde mit dem höheren Arsengehalt einen positiven Einfluss auf die maximale Gasbildungsrate in der Variante mit dem höchsten Konzentratanteil zu nehmen. Ein begünstigender Effekt von Arsen auf die Mikroben wird unter Kapitel 7.1.2 diskutiert.

In einer Untersuchung von Böden in der Gegend um Freiberg (Erzgebirge) stieg die Löslichkeit von Arsen in der Erde erst bei einem pH-Wert < 2 auf 50 % des Gesamtarsens an (BOMBACH *et al.*, 1994). Beprobte Erden, aufbereitet als Suspension, wiesen vorrangig pH-Werte zwischen 5,5 und 7,0 auf. Die Wasserlöslichkeit von Arsen in stark kontaminierten Böden (100 bis 1200 mg As/kg) variierte hierbei zwischen 1,5 und 5,9 % des Gesamtarsengehaltes (BOMBACH *et al.*, 1994).

Die Löslichkeit von Arsen in der Erde und auch dessen Toxizität hängen neben dem pH-Wert auch maßgeblich vom E_h ab. MASSCHELEYN *et al.* (1991) konnten nach 24-tägiger Äquilibrierung einer Bodenprobe unter natürlichen pH-Wert-Bedingungen bei einem geringen E_h (-200 mV) eine 13fache Steigerung des Anteils an löslichem Arsen auf über 40 % der Gesamtarsenmenge (zu 90 % in Form vom Arsenit) gegenüber einem hohen E_h (500 mV) feststellen (Tab. 11). Dabei wurde Arsenat aus Verbindungen (z.B. Eisen- oder Manganarsenaten) freigesetzt und aufgrund des geringen E_h zu Arsenit reduziert. Bei

einem E_h von -200 mV führte in einem weiteren Versuch ein pH-Wert von 8 zu einer geringen Absenkung der Löslichkeit und damit auch der Konzentration an Arsenit gegenüber den natürlichen pH-Wert-Bedingungen. Bei einem pH-Wert von 5 ging kein Arsen mehr in Lösung und konnte damit auch nicht reduziert werden. Lediglich bei einer hohen Löslichkeit von Arsen und einem E_h im positiven Bereich (pH 8,0, E_h ab 200 mV) finden keine Reduktionsvorgänge statt, sodass Arsen als Arsenat vorliegt.

Tabelle 11: Einfluss von E_h und pH-Wert auf das Löslichkeits- ($\uparrow\downarrow$) und Reduktionsverhalten ($\uparrow\downarrow$) von Arsen in Bodensuspensionen (modifiziert nach MASSCHELEYN *et al.*, 1991)

E_h (mV) \ pH-Wert	-200	0	500
5,0	//	$\uparrow\uparrow$ $\uparrow\uparrow$	$\downarrow\downarrow$ /
natürlich ¹	$\uparrow\uparrow$ $\uparrow\uparrow$	\uparrow \uparrow	\downarrow /
8,0	\uparrow \uparrow	\uparrow \uparrow	\uparrow /

¹ = ungesteuert; 7,2 bei -200 mV, 7,0 bei 0 mV und 5,2 für 500 mV

Löslichkeit: / - keine, $\downarrow\downarrow$ - sehr gering, \downarrow - gering, \uparrow - hoch, $\uparrow\uparrow$ - sehr hoch
 Reduktion: / - keine, $\downarrow\downarrow$ - sehr gering, \downarrow - gering, \uparrow - hoch, $\uparrow\uparrow$ - sehr hoch

Diese Erkenntnisse lassen möglicherweise einige Rückschlüsse auf die Löslichkeit des Arsens aus der aufgenommenen Erde im Pansen zu. In Abhängigkeit vom pH-Wert und E_h in der Erde und im Pansen kann in Verbindung mit den Ergebnissen folgender Untersuchungen eine Übertragbarkeit der Effekte diskutiert werden: ABE *et al.* (1973) erforschten die Veränderung des E_h in Abhängigkeit vom Futtermittel im Pansensaft von Rindern. Sie ermittelten bei der Fütterung einer konzentratarmen Basaldiät (aus Reisstroh, Luzernemehl und Konzentratfutter im Verhältnis 2:2:1) ein geringeres E_h im Pansensaft als nach einer 7-tägigen Fütterung einer konzentratreichen Ration (-134 vs. -59 mV). Letztere ging mit einem sinkenden pH-Wert im Pansen von 7,2 auf 5,5 einher. Unter Berücksichtigung des negativen E_h und des pH-neutral-nahen Milieus im Pansen bei einem normalen Konzentratanteil im Futter scheint die Wahrscheinlichkeit einer Mobilisierung von Arsen aus der Erde durchaus hoch. Somit wäre aufgrund der bestehenden Redox-Bedingungen im Pansen auch eine entsprechende Menge an Arsenit für die Pansenmikroben und das Tier verfügbar. In einem *in vitro*-Versuch verlief die Reduktion von Arsenat durch Mikroorganismen des Pansens aber mit 1 %/h (bei 39 °C) relativ langsam (FORSBERG, 1978). Jedoch hatte das Inkubationsmedium nur einen 10 %igen

Anteil an Pansensaft, sodass man *in vivo* durchaus mit einer höheren Reduktionsrate rechnen kann.

Eine schnelle Mobilisierung von Arsen in der Erde durch im Boden vorkommende Mikroben konnte sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen in einem *in vitro*-Versuch von TURPEINEN *et al.* (1999) nachgewiesen werden. Innerhalb von 5 Tagen stieg die Konzentration an gelöstem Arsen um den Faktor 6,4 in stark arsenkontaminierten Böden bis 26100 mg/kg. Daneben hat auch der Anteil an organischer Masse bzw. Säuren (Huminsäuren, Fulvinsäuren) und Ton in der Erde Auswirkungen auf die Sorption von Arsen (BOWELL, 1994). Infolge einer Konkurrenz zwischen den negativ geladenen organischen Säuren und Arsenspezies (vor allem Arsenat) um Bindungsstellen an den positiv geladenen mineralischen Bodenbestandteilen, steigt bei einem höheren Anteil an organischen Säuren der Anteil an freiem Arsen in der Erde. Weiterhin wurden die Zusammenhänge zwischen pH-Wert, E_h und der Löslichkeit von Arsen folgendermaßen erfasst (BOWELL, 1994): Die Bindung von Arsenat, hauptsächlich in Form von $H_2AsO_4^-$ und $HAsO_4^{2-}$, im pH-Wert-Bereich von 4 bis 8 ist aufgrund der elektrostatischen Anziehung durch die positiv geladenen mineralischen Komponenten des Bodens recht hoch. Mit steigendem pH-Wert werden diese Oberflächenladungen zunehmend negativ geladen, wodurch Arsenat wieder freigesetzt wird. Bei einem pH-Wert < 4 sinkt die Sorption aber auch durch den Zerfall von Eisenoxyhydroxiden und der damit verbundenen Freisetzung des darin enthaltenen Arsens. Ähnlich verhält sich auch Arsenit, obwohl die Bindung von Arsenat grundsätzlich stärker ist. Arsenit kommt fast ausschließlich im reduzierenden Milieu als Folge einer Arsenat-Freisetzung aus Eisenoxyhydroxiden und anschließender Reduktion vor. Das Zusammenspiel sämtlicher Faktoren ist äußerst komplex und muss als Gesamtheit betrachtet werden, wodurch der Anteil an gelöstem und reduziertem Arsen im Boden beeinflusst wird. Dieser ist letztendlich ausschlaggebend für eine mögliche Entfaltung einer Wirkung im Organismus.

Die Bedingungen im vorliegenden *in vitro*-Versuch zur Gasbildung unter Einsatz arsenhaltiger Erde waren möglicherweise dahingehend nicht förderlich, um wirksame Mengen an Arsen mobilisieren bzw. die Mikroben damit nachweislich in ihrer Aktivität verändern zu können. Andererseits könnte die Bindung des Arsens an die Bestandteile des Bodens auch entsprechend stark gewesen sein, sodass lediglich im höheren oder sehr niedrigen pH-Wert-Milieu eine Lösung des Arsens möglich gewesen wäre. Die Pufferkapazität der Inkubationslösung wirkte trotz der Verdünnung mit destilliertem

Wasser möglicherweise dennoch einer pH-Wert-Absenkung entgegen. Obwohl die Bedingungen im Pansen scheinbar zu einer Mobilisierung von Arsen aus der Erde und dessen Reduktion zu Arsenit beitragen könnten, wurden keine wesentlichen Beeinträchtigungen der mikrobiellen Fermentation festgestellt, gemessen anhand der Gasbildung *in vitro*. Möglicherweise waren sowohl die Konzentrationen an gelöstem Arsen und auch an Gesamtarsen in der eingesetzten Erde nicht hoch genug, um nachweislich Effekte zu erzielen.

Wie bereits erwähnt, ist es das Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren, das bei der Lösung von Arsen aus der Erde von Bedeutung ist. Bei einem geringen Anteil an gelöstem Arsen in der Erde kann nur diese eventuelle Wirkung entfalten, wenn im Pansen kein weiteres Arsen freigesetzt wird. Ist der Anteil an gelöstem Arsen bereits in der aufgenommenen Erde hoch, wäre lediglich bei einem pH-Wert-Abfall des Panseninhaltes auf 5 eine Verringerung des gelösten Arsens denkbar, abgeleitet von den Erkenntnissen der Untersuchung der Bodensuspension (Tab. 11). Das Potenzial der Reduktion von Arsenat im Pansen ist dagegen in erster Linie abhängig vom E_h und der Menge an gelöstem Arsen. Eine Einstellung und Verfolgung des pH-Wertes und des E_h und damit die Einstellung eines kontrollierten Gehaltes an freiem Arsen über das Milieu der Inkubationslösung in diesem Untersuchungssystem ist nicht möglich.

Die Wertung der Ergebnisse wäre vermutlich aussagekräftiger, wenn der Anteil an gelöstem Arsen und womöglich noch die Speziesverteilung (Arsenat, Arsenit) bekannt gewesen wäre, obwohl eine Verfolgung der Speziesumwandlung während des Versuches (Reduktion von Arsenit, Oxidation von Arsenat) ebenfalls nicht möglich gewesen wäre. Der Anteil an gelöstem Arsen in der Erde hätte für eine messbare Wirkung des Arsens auf die Gasbildung wahrscheinlich noch höher sein müssen, als in den nachfolgend diskutierten Versuchen mit der Zulage von Arsentrioxid und Na-Arsenat (50 mg As/kg T), da man hier von einer hohen Löslichkeit ausgehen kann und selbst diese Arsenkonzentration nur geringe Effekte bedingte.

7.1.2 Zulage von Arsentrioxid und Na-Arsenat

Beim Einsatz der synthetischen Arsenverbindungen wurden aufgrund der höheren Verfügbarkeit des Arsens eher Effekte auf die mikrobielle Aktivität erwartet. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Anreicherung mit Arsentrioxid nicht wie geplant funktionierte. Gründe dafür sind schwer nachvollziehbar, da ein Kalkulationsfehler

ausgeschlossen wird und ein Verdampfen von Arsen (bei der Herstellung der Aufschlammung) noch nicht bei 65 °C eintritt.

Das Gasbildungspotenzial war allgemein höher als im Versuch mit dem Zusatz von Erde. Ein Grund war hier zum Einen die Rohnährstoffzusammensetzung des Futters. Zum anderen wurde in der Variante mit der Erde ein Anteil an fermentierbarem Substrat durch Erde substituiert, sodass die absolute Menge an verfügbaren Rohnährstoffen infolge dessen sank. Das signifikant höhere Gasbildungspotenzial in den Varianten mit der höchsten Arsentrioxid-Zulage (50 mg As/kg T) und der geringsten Na-Arsenat-Zulage (2 mg As/kg T) gegenüber der Kontrolle weist auf einen Einfluss der Arsenzulage hin. Die Art der Arsenzulage hatte kaum eine Auswirkung auf die Höhe des Gasbildungspotenzials. Das späte Erreichen der Wendepunkte deutet auf einen verzögerten Fermentationsstart der Mikroben mit steigendem Arsengehalt hin, sowohl bei der Zulage von Arsentrioxid, als auch von Na-Arsenat. Diese Verzögerung war in der Kontrolle ohne Arsenzulage am geringsten – mit Ausnahme der Variante mit 50 mg As/kg T als Na-Arsenat. Der hier noch zeitiger erreichte Wendepunkt, die im Vergleich geringere maximale Gasbildungsrate und auch der abweichende Verlauf der Funktion in der grafischen Darstellung weisen auf einen Einfluss der Arsenzulage auf die Fermentation hin. Eine statistische Beurteilung dieser Abweichungen war hierbei nicht möglich, da diese beiden Parameter (maximale Gasbildungsrate und Wendepunkt) über eine Schätzgleichung ermittelt wurden.

Die angedeutete Verzögerung des Fermentationsbeginns ist möglicherweise ein Hinweis auf eine negative Wirkung der Arsenzulage. Die relativ geringen Schwankungen in der maximalen Gasbildung und dem Gasbildungspotenzial zwischen den Varianten belegen jedoch möglicherweise eine eintretende Toleranz der Mikroben gegenüber Arsen.

Die signifikant höheren Gasbildungspotenziale zweier Varianten (50 mg As/kg T mit Arsentrioxid und 2 mg As/kg T mit Na-Arsenat) gegenüber der Kontrolle könnten wiederum auf eine begünstigende Wirkung des Arsens auf die Fermentation hinweisen. Dies steht im Gegensatz zu Befunden anderer Autoren. So wurde die Gasbildung bei der Inkubation von Luzerneheu mit einer Pufferlösung und Panseninhalt von Rindern in einem *in vitro*-Versuch durch 5 µg As/ml (in Form von Natriumarsenit) um annähernd 30 % gehemmt (FORSBERG; 1978). Der Effekt einer Na-Arsenat-Zulage war weniger stark ausgeprägt. Die Arsenkonzentration im Inkubationsmedium war mit 5 µg As/ml jedoch vergleichsweise hoch. In der Variante mit der höchsten Arsenzulage im vorliegenden Versuch wurde lediglich eine Arsenkonzentration von 0,03 µg As/ml bei 50 mg As/kg T

durch Na-Arsenat erreicht. Eine Vergleichbarkeit der Versuche kann nur unter Vorbehalt vorgenommen werden, da zum Einen das Verhältnis von Arsen zur Mikrobienmenge aufgrund des abweichenden Versuchsaufbaus (Anteile Pufferlösung, Menge bzw. Einsatz von Pansensaft vs. Panseninhalt) nicht abgeschätzt werden kann und zum Anderen die Messung der Gasbildung bei FORSBERG (1978) nur über max. 3 h erfolgte. Der Einfluss des Einsatzes unterschiedlicher Spendertiere (Schaf vs. Rind) und einer anderen Arsenverbindung (Natriumarsenit) wird als eher gering angenommen.

SIERRA-ALVAREZ *et al.* (2004) konnten in einer Untersuchung eine Hemmung der Aktivität methanogener Bakterien anaerober Schlämme durch Zusatz verschiedener Arsenverbindungen nachweisen, gemessen an der Methangasbildung *in vitro*. Dabei erwiesen sich acetoklastische Methanbildner bei der Verwendung von Arsenit als sensitiver im Vergleich zu hydrogenotrophen Methanbildnern. Daneben reagierten die Mikroben relativ unempfindlich auf Arsenat, bevor dieses dann innerhalb weniger Tage zu Arsenit reduziert wurde. Auch im Pansen befinden sich eine Vielzahl methanbildender Archaeen (JANSSEN & KIRS, 2008), vorwiegend hydrogenotrophe (MADIGAN *et al.*, 2006), sodass gelöstes Arsen in größeren Mengen auch in diesem Ökosystem eine hemmende Wirkung auf die mikrobielle Aktivität ausüben könnte.

Eine höhere Sensitivität von Bakterien gegenüber Arsen im Vergleich zu Protozoen wurde in einem weiteren Teilversuch von FORSBERG (1978) erwiesen und lässt Rückschlüsse auf die hohe Toxizität der geringen Arsenit-Dosis auf die methanogenen Bakterien im Versuch von SIERRA-ALVAREZ *et al.* (2004) zu. Variabilitäten im Verhältnis von Bakterien und Protozoen im Pansen bedingen daher möglicherweise unterschiedliche Sensitivitäten der gesamten Pansenflora gegenüber Arsen.

In einer weiteren Studie von VÁRADYOVÁ *et al.* (2006) wurde in einem *in vitro*-Versuch die Gasbildung (in ähnlicher Form wie in der vorliegenden Arbeit) einer unkontaminierten Heuprobe mit Pansensaft verfolgt. Dieser wurde von Schafen gewonnen, die in einer stark schwermetallbelasteten Industrieregion über längere Zeit (1 Jahr) weideten. Über einen Inkubationszeitraum von 24 h waren das gebildete Gasvolumen und die Methanproduktion in diesen Proben jeweils um 50 % und 77 % geringer als in einer Kontrolle, in der Pansensaft eingesetzt wurde, der Schafen einer unkontaminierten Gegend entstammte. Der Arsengehalt im Boden war mit 75 mg As/kg allerdings nicht enorm hoch, weshalb der

hohe Anteil anderer toxischer Metalle (Hg, Pb, Cu, Cd) möglicherweise einen stärkeren Einfluss auf die Hemmung der Fermentation ausgeübt hat.

Der begünstigende Effekt der Arsenzulage auf die Gasbildung in zwei Varianten mit Arsen könnte auf dessen Nutzung in der Atmungskette der Mikroben zurückgeführt werden. OREMLAND *et al.* (2002) wiesen bei chemolithotrophen Bakterien eine Energiegewinnung durch die Oxidation von Arsenit nach. Zu dieser Gruppe gehören auch die im Pansen vorkommenden hydrogenotrophen Bakterien. Durch das anaerobe Milieu scheint eine Oxidation von Arsenit aber eher ausgeschlossen. Es findet wahrscheinlich vielmehr eine Reduktion des Arsenates statt, einerseits durch die cytoplasmatische und andererseits durch die respiratorische Arsenat-Reduktase. Es wurden diverse Bakterien identifiziert, z.B. *Chrysiogenes arsenatis*, *Sulfurospirillum barnesii* und *Sulfurospirillum arsenophilus*, *Shewanella*-Bakterien, sowie *Desulfotomaculum auripigmentum* (KRAFFT & MACY, 1998; LAVERMAN *et al.*, 1995; SALTIKOV & NEWMAN, 2003; NEWMAN *et al.*, 1997), die mittels der respiratorischen Arsenat-Reduktase bei der Oxidation organischer Substanzen (z.B. Acetat, Laktat, Pyruvat) oder Wasserstoff (STOLZ & OREMLAND, 1999) in der anaeroben Atmungskette Arsenat als terminalen e^- -Akzeptor nutzen können (KRAFFT & MACY, 1998). Die cytoplasmatische Arsenat-Reduktase spielt hierbei keine Rolle, sondern ist Teil des Resistenzsystems bei der Abwehr von Arsen. Über das Vorkommen der genannten Mikroben im Pansen kann jedoch nur spekuliert werden, obwohl in einem *in vitro*-Versuch unter anaeroben Bedingungen die Nutzung von Arsenat als e^- -Akzeptor in der Atmungskette durch Mikroben des Pansensaftes bereits nachgewiesen werden konnten (HERBEL *et al.*, 2002). Eine erhöhte Energiegewinnung durch diesen Mechanismus über das natürliche Maß hinaus wurde nicht untersucht. Die Reduktion von Arsenat setzte auch erst 1 bis 3 Tage nach Beginn der Inkubation ein. Ob das höhere Gasbildungspotenzial in den zwei Varianten mit Arsen hierdurch erklärt werden kann, ist fraglich. Zudem nahm die Arsenzulage in den acht weiteren Varianten mit Arsen wiederum keinen Einfluss auf das Gasbildungspotenzial.

Eine Ursache der weitestgehend unbeeinträchtigten Fermentationsaktivität bestand womöglich in einer eintretenden Toleranz der Pansenmikroben. Wie in Kapitel 2.3 bereits erläutert, besitzen Mikroben verschiedene Resistenzmechanismen gegenüber Arsen. Durch die Weitergabe von genetisch determinierten Resistenzmechanismen in Form von Plasmiden und durch die Vermehrung arsenintoleranter Pansenmikroben könnte die Population im Versuch eine Toleranz gegenüber Arsen entwickelt haben.

Die Entgiftung von aufgenommenem Arsen durch Methylierung ist bei sämtlichen Organismen (Mensch, Tier, Pflanze, Mikroben) vorzufinden. Dieser Mechanismus trug womöglich ebenfalls zur Tolerierung der eingesetzten Arsenmengen bei. TURPEINEN *et al.* (1999) konnten dagegen bei Bodenbakterien innerhalb einer Inkubationszeit von 5 Tagen in anaerober Atmosphäre keine Methylierungsaktivitäten feststellen.

7.1.3 Überlegungen zur Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Wiederkäuer

Das Fassungsvermögen des gesamten Magensystems von Kleinwiederkäuern wird mit 10 bis 22 l angegeben (NICKEL *et al.*, 2004), wobei 75 % der Füllung auf den Pansen entfallen (ACHILLES, 2008). Bei einem angenommenen Panseninhalt von 10 l und der von FORSBERG (1978) ermittelten Arsenkonzentration von 5 µg As/ml, die *in vitro* zu einer 30 %igen Hemmung der Fermentationsrate führte, würde eine Menge von 50 mg gelöstem Arsenit die Mikroben im Pansen nachweislich beeinträchtigen. Ausgehend von einem täglichen Trockenmasseverzehr von 2 kg müsste der Anteil an löslichem Arsen rund 25 mg As/kg T betragen. Da der Gehalt an gelöstem Arsen in der Erde je nach Umweltbedingungen stark variieren kann und durch das Milieu im Pansen die Löslichkeit von Arsen in unbekanntem Maße erhöht werden könnte, ist eine Abschätzung der Höhe der Erde-Aufnahme für eine Beeinträchtigung der Fermentation schwierig. Auch der Verdünnungseffekt durch die eingesetzte Pufferlösung darf nicht vernachlässigt werden. In den *in vitro*-Versuchen zur Gasbildung ist deren Verwendung unabdingbar. Dadurch tritt jedoch ein Verdünnungseffekt der Mikrobenpopulation ein, wodurch dem einzelnen Mikroorganismus – absolut betrachtet – eine größere Menge an Arsen zur Verfügung steht und zu Schäden führen kann. Bezogen auf das Tier bedeutet das womöglich eine Überschätzung der Toxizität der Arsendosis, die im *in vitro*-Versuch bereits zu Beeinträchtigungen in der Gasbildung geführt hat. Dennoch erscheint die Arsenmenge, die zu einer Hemmung der Fermentation führte, im Hinblick auf die teilweise hohe Arsenbelastung mancher Regionen Sachsens durchaus kritisch. Trotzdem können *in vitro*-Versuche nur Anhaltspunkte zu einer Wirkung geben und nicht 1:1 auf das Tier übertragen werden.

7.2 Verdaulichkeitsversuch

Im Versuch zur Verfütterung eines Anteils an arsenhaltiger Erde an Hammel waren die Effekte auf die Verdaulichkeiten der Rohnährstoffe zwischen der Kontroll- und

Arsengruppe ungerichtet. Die in unterschiedlichem Maße beeinflusste Verdaulichkeit der Rohfaser und des Rohproteins in Abhängigkeit von der Grundfutterquelle war möglicherweise Resultat einer durch die Erde an sich beeinträchtigten Verdaulichkeit und trat nicht als Folge des hohen Arsengehaltes auf. Sinnvoller wäre eine gleichartige Behandlung der Kontrollgruppe mit Erde aus einem unkontaminierten Gebiet gewesen. Auch die unzureichende Aufnahme der Versuchsfutter aufgrund der zugesetzten Erde führte zu Einschränkungen in der Vergleichbarkeit der Verdaulichkeiten zwischen beiden Versuchsgruppen. Die verringerte Verdaulichkeit des Rohproteins in der Arsengruppe könnte aber auch auf einen hemmenden Einfluss des Arsens hinweisen. Der signifikante Unterschied im Abbau des Rohfettes bei der Vorlage von Heu resultiert wahrscheinlich aus Messungenauigkeiten, die aufgrund des geringen Rohfettgehaltes im Heu auftraten.

HOOVER (1986) beschrieb einen negativen Einfluss eines geringen pH-Wertes auf die Faserverdaulichkeit im Pansen, hervorgerufen durch einen hohen Anteil an leicht fermentierbaren Kohlenhydraten in der Ration. Im vorliegenden Versuch wurde jedoch kein Konzentratfutter eingesetzt, sodass eine Beeinträchtigung der zellulolytischen Aktivität aufgrund des geringen pH-Wertes nicht möglich war.

Die Aufnahme von Erde durch weidende Tiere kann weit über 10 % der gesamten Trockenmasse betragen (SCAN, 2003; ABRAHAMS & STEIGMAJER, 2003). Bei einem Arsengehalt von 100 mg/kg Erde und einer Trockenmasseaufnahme von 2000 g/d beträgt die aufgenommene Arsenmenge (bei 10 % an der T) 20 mg. Inwieweit dieses Arsen verfügbar ist bzw. sein kann wurde bereits diskutiert.

7.3 Pansensimulation

Der tendenziell höhere Abbau des Rohproteins, der Rohfaser und der N-freien Extraktstoffe bei der Zulage von 20 mg As/kg T in Form von Na-Arsenat deutet – ebenso wie im Versuch zur Gasbildung – auf eine gesteigerte mikrobielle Fermentation hin. Die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese wurde nicht signifikant beeinträchtigt. Auch im Aminosäuremuster des mikrobiellen Proteins konnten keine Unterschiede zwischen den Varianten festgestellt werden.

Da die Höhe des Abbaus der Rohfaser bei der Zulage von 5 und 20 mg As/kg T als Arsentrioxid tendenziell geringer war als in allen anderen Varianten, könnte sich hier ein

hemmender Effekt des Arsens angedeutet haben. Der Abbau der organischen Substanz, des Rohproteins und der N-freien Extraktstoffe wurde durch den Zusatz von Arsentrioxid nicht beeinflusst.

Die gesteigerte Fermentationsaktivität der Mikroben durch die Zulage von Na-Arsenat zum Futter wurde bereits diskutiert und konnte auch in diesem Versuch nicht abschließend geklärt werden. Untersuchungen mit ähnlichen Erkenntnissen existieren nicht. Da Arsenat im anaeroben Milieu reduziert wird, hat womöglich dieser Prozess an sich einen positiven Einfluss. Denkbar wäre dann auch, dass das entstehende Arsenit eine toxische Wirkung entfalten müsste. Der eingetretene Effekt kann jedoch, wie erwähnt, nicht erklärt werden.

Bisherige *in vitro*-Untersuchungen zur Wirkung von Arsen auf Pansenmikroben erfolgten bisher hauptsächlich auf dem Gebiet der Resistenz- und Redoxmechanismen, getestet an Kulturen, isolierten Bakterien oder direkt mit Pansensaft. Zur Wirkung des Arsens auf die Fermentation, gemessen anhand des Abbaus der Rohnährstoffe *in vitro*, wurden bisher keine Studien durchgeführt, wodurch ein Vergleich mit eigenen Erkenntnissen nicht möglich ist.

Da lediglich in den Varianten mit der Zulage von 20 mg As/kg T in den Überläufen höhere Arsenkonzentrationen detektierbar waren, ist aus versuchstechnischen Gründen davon auszugehen, dass die Arsenkonzentration in der flüssigen Phase des Fermenters ebenso gering war. Daraus, und auch anhand der Analysen, wird ein hoher Verbleib des Arsens in den Futterresten ersichtlich. Mikroben der flüssigen Phase kamen dadurch nur wenig mit dem Arsen in Kontakt. Da die errechnete Wiederfindungsrate maximal 80 % betrug, kann vermutet werden, dass einerseits ein Teil des Arsens in den partikelassoziierten Mikroben verblieb, welche durch die Spülung der Beutel mit den Futterresten beim täglichen Wechsel wieder dem System zugeführt wurden. Andererseits wird möglicherweise ein weiterer Anteil der Differenz zwischen der zu- und abgeführten Menge des Arsens im System selbst (Schläuche, Fermenterwände, etc.) zurückgeblieben sein. Eine Messung der Arsenkonzentration in den Mikroben selbst wurde nicht durchgeführt.

Der verringerte Rohfaserabbau bei der Zulage von Arsentrioxid lässt möglicherweise auf eine Beeinträchtigung des Abbauweges der Rohfaser schließen. Verschiedene durch Arsen beeinträchtigbare Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels wurden bisher identifiziert (REICHL *et al.*, 1989; PETRICK *et al.*, 2001; PAL & CHATTERJEE, 2005) und der PDH-

Komplex dabei für äußerst sensitiv befunden (HU *et al.*, 1998, PETRICK *et al.*, 2001). Auch bei Bakterien katalysiert dieser im Abbau der Kohlenhydrate den Reaktionsschritt von Pyruvat zu Acetyl-CoA (ZAUNMÜLLER *et al.*, 2006), ein notwendiger Schritt zur Bildung von Butyrat (neben Acetat) im Pansen. Angesichts der unbeeinträchtigten Verdaulichkeit der N-freien Extraktstoffe, deren Abbau zu Butyrat ebenso den PDH-Komplex benötigt, scheint die Ursache der verminderten Verdaulichkeit noch vor diesem Reaktionsschritt zu liegen, demnach beim Abbau der Polysaccharide zu Monosacchariden. Eine Hemmung der daran beteiligten Enzyme (z.B. Cellulase, Glukanase, Xylanase, Glukosidase, Amylase) wurde bisher nicht untersucht. In einer Studie zur Untersuchung der mikrobiellen Aktivität in Sedimenten einer unter anderem arsenbelasteten ehemaligen Bergbauregion (USA) deutete sich sogar eine Stimulierung der Glukosidaseaktivität durch Arsen an (BURTON *et al.*, 1987), in Übereinstimmung mit weiteren Untersuchungen (z.B. BURTON & LANZA, 1985). Die Anregung einiger Enzyme durch geringe Metallkonzentrationen wurde hier mit dem Prinzip der „Arndt-Schulz`schen Regel“ begründet. Diese besagt, dass schwache Reize biologische Prozesse anregen, mittelstarke Reize fördernd wirken, während starke Reize sie hemmen und stärkste Reize sie lähmen sollen (MARTIUS, 1923). Ob mit diesem Effekt auch der gesteigerte Abbau unter Zulage von Na-Arsenat gerechtfertigt werden kann ist fraglich, da es in keiner anderen Untersuchung (unabhängig von der eingesetzten Konzentration) positive Wirkungen entfaltete.

8 *In vivo*-Studien: Material und Methoden

Die im folgenden erläuterten Versuche wurden zur Untersuchung der Arsenakkumulation im Schaf bei kontinuierlicher Aufnahme eines arsenhaltigen Futtermittels durchgeführt. Verschiedene tierische Gewebe, sowie Milch und Serum wurden zur Ermittlung der Arsenkonzentrationen herangezogen. Daneben wurde ein Einfluss des Arsens auf verschiedene Blutparameter und Enzymaktivitäten untersucht. Ein weiterer Versuch diente wiederum der Ermittlung eines Einflusses von Arsen auf die Verdaulichkeit von Rohnährstoffen und der Untersuchung der Abreicherung von Arsen aus dem Körper nach dessen Absatz.

8.1 Arsenkontamination des Futters

Zur Simulation einer Arsenkontamination des Futters wurde zu zwei Zeitpunkten (aufgrund der großen Menge) mehlförmiges Konzentratfutter („Schäferstolz“, Mischfutter und Landhandel GmbH, Edderitz, Tab. A1) in einer Vormischung mit Arsen trioxid vermengt und anschließend in einem Trommelmischer mit der restlichen Menge an mehlförmigem Konzentratfutter vereinigt, um die angestrebte Arsenkonzentration zu erhalten. Die Pelletierung erfolgte in einer Pelletpresse mit einer Ringmatrize (\varnothing 3 mm) und einem Durchflussvolumen von ca. 1 t/h (simi, Modell 304/78-0, keine Ortsangabe). Für beide *in vivo*-Versuche wurde eine Arsenkonzentration von 20 mg As/kg T in der Gesamtration angestrebt. Unter Berücksichtigung der Trockenmasse der eingesetzten Grundfutter- bzw. Konzentratmenge wurde für das Konzentrat eine Arsenkonzentration von 70 mg As/kg T kalkuliert. Bei einem Arsenanteil von 75 % im Arsen trioxid betrug die eingewogene Menge dieser Verbindung 93 mg As/kg T im Konzentrat. Die Arsenanalyse der ersten Mischung bestätigte einen Gehalt von 68 bzw. 62 mg As/kg T. (Die Ursache der verschiedenen Werte wird im Kapitel 8.4.4 erklärt.) Eine weitere Charge an arsenkontaminiertem Konzentratfutter wurde zu einem zweiten Zeitpunkt angemischt und wies einen Gehalt von 72 mg As/kg T auf.

8.2 Verdaulichkeitsversuch

8.2.1 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau erfolgte in ähnlicher Weise wie im Verdaulichkeitsversuch mit dem Zusatz arsenhaltiger Erde (Kapitel 5.2.2.2). Es wurden wiederum je Gruppe („Arsen“ und „Kontrolle“) 4 Hammel der Rasse Rauhwolliges Pommersches Landschaf im Nutztierwissenschaftlichen Zentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg aufgestellt. Die Aufstallung und die Probennahmen verliefen analog Kapitel 5.2.2.2 mit folgenden Ausnahmen: Die Phase zur Anpassung an die Ration betrug 21 Tage und die Sammelperiode 7 Tage. Für die Erstellung der Kot-Sammelprobe wurden 20 % der täglich ausgeschiedenen Menge entnommen.

Die Berechnung der Roh Nährstoffverdaulichkeit und die statistische Auswertung erfolgten auf dieselbe Weise wie unter Kapitel 5.2.2.3 und 5.2.2.5 beschrieben.

8.2.2 Versuchsration

Die Tagesration pro Tier bestand aus 500 g Grassilage, 250 g Heu und 150 g Stroh (Originalsubstanz) bei einem kalkulierten Gehalt an Umsetzbarer Energie von 8,9 MJ/kg T. Die Roh Nährstoffzusammensetzung kann Tab. A14 entnommen werden. In Vorbereitung auf den Versuch wurde das Futter portionsweise eingewogen, wobei repräsentative Proben für die Analyse entnommen wurden. Bis zum Zeitpunkt der Verfütterung wurden Heu und Stroh trocken und bei Raumtemperatur gelagert, die Silage bei -18 °C. Zusätzlich wurde entsprechend der Variante („Kontrolle“ bzw. „Arsen“) 200 g pelletiertes Konzentratfutter ohne oder mit Arsen vorgelegt. Die analysierte Arsenkonzentration der Ration betrug in der Kontrollgruppe 0,2 mg As/kg T und in der Arsengruppe 18,3 mg As/kg T. Zu den Fütterungszeitpunkten (7⁰⁰ Uhr und 14⁰⁰ Uhr) wurde je die Hälfte der gesamten Tagesration gefüttert. Das Konzentratfutter wurde stets separat vor dem Gemisch an Grundfuttermitteln vorgelegt. Futterreste wurden in der Sammelperiode tierindividuell erfasst. Die Aufbereitung von Futter, Kot und Futterresten und die Roh Nährstoffanalyse erfolgten wie in Kapitel 5.2.2.1 bzw. 5.4 beschrieben. Reste an Konzentratfutter waren nicht vorhanden. Tränkwasser stand uneingeschränkt zur Verfügung.

8.2.3 Arsenanreicherung

Bis ca. 12 Tage (282 h) nach Ende des Verdaulichkeitsversuches wurden zu definierten Zeitpunkten nach der letzten Fütterung von arsenhaltigem Konzentrat Kotproben jedes

einzelnen Hammels der Arsengruppe gewonnen. Der Kot wurde erstmalig nach 6 h und weiterhin in 4-stündigen Zeitabständen beprobt. Von Stunde 66 bis 102 nach Ende des Verdaulichkeitsversuches wurden in 6-stündigen Zeitabständen Kotproben gewonnen. Bis Stunde 138 erfolgte die Beprobung in 12-stündigen und bis zum Ende der Untersuchung der Arsenabreicherung in 24-stündigen Abständen. Die Ration für die Hammel wurde beibehalten, das arsenhaltige Konzentrat jedoch durch unkontaminiertes Konzentratfutter ersetzt. Die erste morgendliche Fütterung dieser Ration erfolgte am Tag nach Beendigung des Verdaulichkeitsversuches und wurde als Zeitpunkt des Beginns des Teilversuches zur Abreicherung von Arsen festgesetzt. Ab 30 Minuten vor jedem festgelegten Beprobungszeitpunkt wurde innerhalb der nächsten Stunde, also bis 30 Minuten nach diesem Zeitpunkt, der erste anfallende Kot beprobt. Konnte in dieser Zeit keine Probe gewonnen werden, wurde der Kot aus dem Zeitraum bis zur nächsten Probennahme verwendet. Über die Ermittlung der Arsenkonzentration zu den entsprechenden Zeitpunkten konnte die Ausscheidung von Arsen über den Kot verfolgt werden.

8.3 Verbleib von Arsen in tragenden Mutterschafen und in Lämmern

8.3.1 Versuchstiere und Haltung

Es wurden 24 tragende Mutterschafe der Rasse Merino Landschaf (Landgut Brehnau KG, Schochwitz) in einem Stall des Nutztierwissenschaftlichen Zentrums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Einzelboxen (Grundfläche ca. 2,2 m x 1,2 m) auf Tiefstreu aufgestellt und jeweils zwölf Tiere zufällig der Kontroll- oder Arsengruppe zugeordnet. Mindestens 3 Mutterschafe je Gruppe waren gemäß Ultraschalluntersuchung mit Zwillingen tragend. Zusätzlich wurden 3 nichttragende Mutterschafe in einer Gruppenbucht untergebracht. Die Einstellung der Tiere erfolgte im niedertragenden Stadium, ca. 3 Monate nach dem Deckakt und 6 Tage vor Versuchsbeginn. Die Versuchsdauer betrug 5 Monate. Der Versuchsstall wurde je nach Bedarf belüftet, mittels einem gasbetriebenen Warmlufterzeuger beheizt und durch Tageslicht erhellt.

8.3.2 Versuchsration Mutterschafe

In Abhängigkeit der Trächtigkeitsstadien wurde die tägliche Gesamtration aus Grassilage, Heu, Stroh und Konzentratfutter an den Nährstoffbedarf der Tiere angepasst (Tab. 12, Tab.

A15). Für die Kalkulation der Arsenkonzentration in der Gesamtration wurde eine Strohaufnahme von 200 g unterstellt.

Die Gesamtarsenaufnahme in der Arsengruppe betrug in den verschiedenen Stadien 25 bis 46 mg As/Tier und Tag (Tab. 12). Dies entsprach 16 bis 20 mg As/kg T. Da die tierindividuelle Strohaufnahme variierte, wurde in der Tabelle zusätzlich die Arsenkonzentration in der Ration ohne Stroh angegeben. Im niedertragenden Stadium (49 Tage ab Versuchsbeginn) nahm jedes der Mutterschafe 1,2 g Arsen auf. In der Hochträchtigkeit (ab 4 Wochen vor dem errechneten Termin der Ablammung) und auch in der Laktationsphase wurde das Konzentratfutter der Arsengruppe mit unkontaminiertem Konzentratfutter gemischt, um einer zu hohen absoluten Arsenaufnahme vorzubeugen.

Der Arsengehalt im Grundfutter wurde nicht analysiert. Die Futtervorlage erfolgte täglich um 7⁰⁰ Uhr und um 14⁰⁰ Uhr. Das Konzentratfutter wurde für jedes Tier separat eingewogen und je die Hälfte davon zu einer Mahlzeit verabreicht. Zur morgendlichen Fütterung wurde Silage gleichzeitig für mehrere Tiere in entsprechender Menge eingewogen und gleichmäßig verteilt. Zur Fütterung am Mittag wurde Heu, im gleichen Verfahren wie die Silage, verabreicht. Zusätzlich wurden die Tiere mit Stroh versorgt.

Tabelle 12: Zusammensetzung der täglichen Gesamtration (g Originalsubstanz) der Mutterschafe und Arsenaufnahme der Mutterschafe der Arsengruppe in den verschiedenen Stadien der Trächtigkeit

	Grassilage	Heu	Konzentrat	Stroh	Aufnahme _{As} (mg As/Tier und Tag)	c _{As} in T (mg As/kg T)	
						mit Stroh	ohne Stroh
niedertragend	1000	500	400	ad	24,4	19,7	22,9
hochtragend	1500	800	700 ¹	libitum ³	35,7	17,1	18,6
laktierend	2000	1000	1000 ²		45,4	15,5	16,5

¹ in der Arsengruppe: 550 g kontaminiertes Konzentrat + 150 g Konzentrat ohne Arsen

² in der Arsengruppe: 700 g kontaminiertes Konzentrat + 300 g Konzentrat ohne Arsen

³ 200 g/Tier und Tag angenommen

T – Trockenmasse

Frisches Tränkwasser stand während des gesamten Versuches uneingeschränkt zur Verfügung.

Die Silage wurde vom landwirtschaftlichen Betrieb „Landgut Krosigk“ bezogen (bis zu 2x wöchentlich) und unter Dach gelagert. Das Heu entstammte ebenfalls diesem Betrieb. Stroh (verschiedene Getreidearten) wurde vom Julius-Kühn-Feld des Institutes für Agrar- und Ernährungswissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg verwendet.

8.3.3 Versuchsration Lämmer

Ab der 5. bis einschließlich der 8. Lebenswoche erhielten die Lämmer ebenfalls Konzentratfutter (Tab. A16). Die nach der Schlachtung zum abblammungsnahen Termin verbliebenen 3 Zwillinglämmer je Gruppe (siehe Kapitel 8.3.4) bekamen täglich variantengetreu 200 g vom selben Konzentratfutter, wie es deren Müttern erhielten (in der Arsengruppe 13 mg As/Tier und Tag). In einer „cross-over“-Behandlung bekamen 3 weitere Lämmer der Arsen- und Kontrollgruppe im selben Lebensabschnitt täglich 200 g Konzentrat der jeweils anderen Gruppe. Damit sollte ein Einfluss einer möglichen Vorbelastung der Lämmer durch das Arsen aus der Muttermilch überprüft werden. Die Aufnahme von Konzentratfutter durch die Lämmer lag (mit Ausnahme eines Ausreißers mit 13 %) im Mittel bei knapp 80 % der vorgelegten Menge (Tab. A16). Lämmer, denen arsenhaltiges Konzentrat zugeteilt wurde, nahmen mit Ausnahme eines Tieres in diesem 4-wöchigen Zeitraum durchschnittlich 281 mg Arsen auf. Das Konzentratfutter für die Müttern und Lämmer wurde jeweils getrennt vorgelegt. Auch während der Säugephase hatten die Lämmer keinen Zugang zum Konzentratfutter der Mutter.

8.3.4 Probennahme

Die Beprobungen wurden analog Tabelle 13 durchgeführt. Die Lebendmassen wurden zu Versuchsbeginn und weiterhin in 4-wöchentlichen Abständen erfasst. Milchproben wurden am Tag der Ablammung genommen, und dann jeweils am Tag der Beprobung von Horn, Wolle und Serum, allerdings im 2-wöchigen Rhythmus. Das Blutserum wurde durch Zentrifugation (10 min, 2000 g, 20 °C) von koaguliertem Vollblut (in Serummonovetten) gewonnen und in Eppendorf-Tubes abgefüllt. Horn wurde mittels einer Klauenzange und stets von der gleichen Klaue gewonnen. Die Wolle wurde mit einer Schermaschine ebenfalls immer vom selben Areal entfernt. Woll-, Horn- und Serumproben wurden bis zur Aufbereitung bei -18 °C gelagert. Vollblutproben wurden in EDTA-Röhrchen abgefüllt

und zur Untersuchung auf den Erythrocyten-, Leukocyten-, Hämoglobingehalt und das Hämatokrit eingeschickt (Laboklin, 97688 Bad Kissingen).

Die Tötung von Mutterschafen und Lämmern zur Entnahme der Gewebeproben fand zu folgenden Zeitpunkten statt:

- 1) *Versuchsbeginn*: Schlachtung von 3 nichttragenden Mutterschafen
- 2) *Ablammung*: pro Gruppe 3 Mutterschafe und deren Lamm + pro Gruppe je 3 Lämmer aus Zwillingsgeburten (mittleres Alter 3 Tage)
- 3) *4 Wochen p.p.*: in der Kontrollgruppe 2 Lämmer, in der Arsengruppe 3 Lämmer (mittleres Alter 28 Tage)
- 4) *8 Wochen p.p.*: je Gruppe 3 Mutterschafe mit verbliebenem Zwillingslamm + 3 weitere Lämmer je Gruppe aus der „cross-over“-Behandlung (mittleres Alter 56 Tage).

Tabelle 13: Beprobungsfrequenz für verschiedene Matrices bei Mutterschafen (M) und Lämmern (L)

Beprobungsfrequenz	Material
2-wöchentlich ab Ablammung (M)	Milch
4-wöchentlich ab Versuchsbeginn (M) bzw. Geburt (L)	Horn (linke Vorderklaue), Wolle (linkes Schulterblatt), Blutserum, Blut ¹
einmalig (M)	Plazenta (wenn vorhanden) Kolostrum
einmalig (M, L)	Gewebe (Leber, Muskel, Niere)

¹ nur bei den Mutterschafen und erstmalig zum zweiten Probennahme-Termin

Es fand eine Beprobung der Leber (*lobus hepatis sinister*), der linken Niere und des Delta-Muskels (*musculus deltoideus*, bei Lämmern zusätzlich des *musculus infraspinatus*) statt. Die Mutterschafe wurden unter Anwendung eines Bolzenschussapparates betäubt, die Lämmer mit den Narkotika Xylazin (2 %) und Ursotamin sediert. Die Tötung erfolgte anschließend durch einen Kehlschnitt und wurde – ebenso wie die Organentnahme – von einem Tierarzt durchgeführt.

Leber, Muskel und Niere wurden nach der Entnahme rasch und stets nach demselben Muster mit einem Skalpell in Stücke von ca. 1 x 1 x 0,5 cm geschnitten. Vor allem in der

Leber und Niere war es aufgrund der Morphologie der Organe notwendig, stets gleiche Abschnitte zu beproben. Innerhalb eines Gewebes wurde eine repräsentative Mischprobe erstellt, die umgehend in Flüssigstickstoff tiefgefroren wurde und im Falle der Messung der Arsenkonzentration bis zur Aufbereitung (Trocknung bei 65 °C, Vermahlung auf 0,5 mm Siebdurchgang) bei -18 °C gelagert wurde. Die Lagerung der Proben für die Aktivitätsmessung der Enzyme erfolgte bei -80 °C. Die Plazenten wurden von Verunreinigungen befreit und ebenfalls bei -18 °C gelagert.

8.3.5 Aufbereitung von Horn, Wolle und Plazenta

Alle Hornproben wurden in einer schwach konzentrierten handwarmen Seifenlösung für ca. 15 min zur besseren Ablösung von Kot-, Harn und Futterresten eingeweicht. Mit einer Schere wurden durch Harn verfärbte Regionen entfernt und mit einer Bürste Verschmutzungen beseitigt. Nach dem Säubern wurde das Horn mit destilliertem Wasser abgespült und für einige Tage luftgetrocknet, bevor es mit einer Zange in kleine Stücke geschnitten und anschließend auf 0,5 mm Siebdurchgang vermahlen wurde.

Die Wollproben wurden in einem Becherglas mit 100 ml Seifenlösung (50 ml Spülmittel + 2 l Wasser) für ca. 15 min unter gelegentlichem Rühren eingeweicht. Danach wurden durch mehrmaliges Spülen mit destilliertem Wasser Schmutz-, Fett- und Spülmittelreste entfernt. Eine Trocknung fand über 24 h bei 65 °C statt. Eine vollständige Entfernung des Wollfettes wurde mit Petrolether (50 ml) in einer Soxhlet-Apparatur (tecator, Soxtec Systems HAT, 1043 Extraction Unit, Rellingen) realisiert. Nach der Trocknung wurde die Wolle in verschließbaren Gefäßen bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Die kompletten, gefrorenen Plazenten wurden mittels einer Bandsäge (Mado, Perfekta Plus, Dornhan) in Scheiben geschnitten und anschließend mit einem Messer in Stücke zerlegt. In einem Kutter erfolgte dann eine grobe Zerkleinerung des Probenmaterials. Die zerkleinerten Plazenten wurden in einer Gefriertrocknungsanlage (Christ Gamma 2-20, Osterode) getrocknet, bevor sie dann in einer Mühle (Foss Tecator Cyclotec, 1093 Sample Mill, Höganäs, Schweden) auf 0,5 mm Siebdurchgang vermahlen wurden.

8.4 Probenaufbereitung und Analysen

8.4.1 Weender Roh Nährstoffe

Die Analyse der Weender Roh Nährstoffe in den Futtermitteln wurde wiederum im institutseigenen Labor nach den Standardmethoden des VDLUFA (NAUMANN und BASSLER, 1976) durchgeführt.

8.4.2 Detergenzienfaser

Die Bestimmung der Detergenzienfaser (ADF und NDF) erfolgte ebenfalls im institutseigenen Labor nach den Vorschriften des VDLUFA (6.5.1 bzw. 6.5.2), basierend auf den von VAN SOEST (1963) beschriebenen Methoden.

8.4.3 Blutbild

Die Analyse des Erythrocyten-, Leukocyten-, Hämoglobingehaltes und Hämatokrits wurde von der Firma Laboklin (97688 Bad Kissingen) unter Anwendung der Methode der Durchflusszytometrie (kombiniert mit einer Peroxidasefärbung) durchgeführt. Die Probe wird dabei in eine Kapillare gesaugt, auf die ein Laserstrahl gerichtet ist. Die Zellen passieren diese Kapillare einzeln hintereinander. Das Licht des Lasers wird dabei durch die verschiedenen Zelltypen in bestimmte Winkel gestreut (Laserstreulicht-Methode) und über Detektoren erfasst. Die Menge des gestreuten Lichtes korreliert mit der Größe und Komplexität der Zelle, sodass folglich die Konzentrationen der verschiedenen Zelltypen ermittelt werden können.

8.4.3.1 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Blutparameter (Erythrocyten-, Leukocyten-, Hämoglobingehalt und Hämatokrit) wurde das Programm SAS 9.1 für Windows herangezogen. Mit der Prozedur *glm* wurden in einem zweifaktoriellen Ansatz signifikante Einflüsse der fixen Effekte „Zeit“ (entsprechend der Versuchsdauer) und „Behandlung“ (Arsen vs. Kontrolle) unter Berücksichtigung ihrer Wechselwirkungen überprüft. Im Mittelwertvergleich wurden signifikante Unterschiede ab einem P-Wert von $\leq 0,05$ erkannt.

8.4.4 Probenaufschluss

Die Proben aus den Versuchen zur Arsenabreicherung in Hammeln und zum Verbleib von Arsen in tragenden Mutterschafen und Lämmern wurden in Stuttgart (Hohenheim) an der Landesanstalt für landwirtschaftliche Chemie in Anlehnung an die VDLUFA-Methode 2.1.3 (BASSLER, 2007) aufgeschlossen. Das Probenmaterial wurde in 10 ml-Aufschlussröhrchen aus Glas eingewogen, mit destilliertem Wasser benetzt und für den anschließenden Aufschluss mit hoch konzentrierter Salpetersäure (65 % w/v) versetzt (Tab. 14). Zur Erhöhung der Arsenkonzentration in den Aufschlüssen der Organ-, Plazenta-, Woll- und Hornproben wurde die Einwaage etwa verdoppelt und das Endvolumen halbiert. Es konnten bis zu 40 Proben pro Durchgang aufgeschlossen werden. Die Glasröhrchen wurden mit Teflondeckeln verschlossen und in einem Gestell in die Vorrichtung des mikrowellengestützten Aufschlussgerätes (ultra CLAVE III, MLS GmbH, Leutkirch im Allgäu; PC-Programm easyCLAVE 5) eingesetzt. Unter PC-Steuerung wurde der Druck stufenweise innerhalb von ca. 30 min von 40 bar auf 90 bar erhöht, während die Temperatur von 25 °C auf 220 °C stieg. Bei einer Höchsttemperatur von 220 °C und einem Druck von 160 bar wurden die Proben über 15 min aufgeschlossen. Danach kühlten die Aufschlüsse auf Zimmertemperatur ab, wurden mit destilliertem Wasser bis zum Endvolumen (5 ml bzw. 10 ml) aufgefüllt und zur Aufbewahrung in Falcon-Tubes (BD Falcon™ Round-Bottom Polypropylene Tubes) überführt. Jede Probe wurde als Doppelbestimmung aufgeschlossen, soweit genug Probenmaterial vorhanden war.

Tabelle 14: Einwaagen des Probenmaterials für den mikrowellengestützten Aufschluss und eingestelltes Endvolumen

	Einwaage	H ₂ O dest. (ml)	HNO ₃ , 65 % (ml)	Endvolumen (ml)
Kot, Konzentratfutter	0,2 - 0,25 g	1	2,5	10
Organe, Plazenta, Wolle, Horn	0,45 - 0,5 g	1	3	5
Serum, Milch, Harn	2 ml	-	2,5	10

Die Aufbereitung und die Messung der Arsenkonzentrationen aller Proben (Futtermittel, Kot, Harn) aus dem Verdaulichkeitsversuch wurden wie unter 5.4.5 bereits beschrieben, durchgeführt.

Die beiden verschiedenen Arsenanalysen (Aufschluss in Stuttgart/institutseigene Messung vs. Aufschluss und Messung in Leipzig) desselben Konzentratfutters ergaben leicht abweichende analysierte Arsenkonzentrationen. Dieses Konzentrat wurde einerseits im Verdaulichkeitsversuch und andererseits im Versuch mit den Mutterschafen eingesetzt. In den in Stuttgart aufgeschlossenen Konzentratproben wurde bei der institutseigenen Messung eine Arsenkonzentration von 68 mg As/kg T analysiert. In den in Leipzig aufgeschlossenen und analysierten Proben wurde eine Arsenkonzentration von 62,3 mg As/kg T gemessen.

Auch die Arsenkonzentrationen derselben Kotproben (Sammelprobe über 7 Tage) aus den Versuchen zur Verdaulichkeit und zur Arsenabreicherung unterschieden sich aufgrund der unterschiedlichen Methoden der Aufbereitung und Analyse. Die Arsenkonzentrationen im Kot, deren Aufschluss in Stuttgart stattfand, waren um 6 bis 25 % höher, als die in Leipzig analysierten Proben. Innerhalb eines Versuches wurden aber einheitlich die institutseigenen oder die Analysenergebnisse aus Leipzig verwendet.

8.4.5 Arsenanalyse

Die Messung von Arsen wurde zum überwiegenden Teil im institutseigenen Labor an einem PC-gesteuerten induktiv gekoppeltem Plasma-Emissionsspektrometer (ICP-OES; JY 24, Jobin Yvon GmbH, München) durchgeführt. Bei einer Wellenlänge von 193,7 nm wurde die Emissionsintensität der durch das Plasma angeregten Elektronen gemessen. Vor jedem Messdurchgang wurde das Gerät in Abhängigkeit von der zu erwartenden Arsenkonzentration in den Proben mit einer Standardreihe von 0 bis 1000 µg As/l (100, 200, 400, 600, 800, 1000 µg As/l; Kot- und Konzentratproben) oder von 0 bis 300 µg As/l (30, 60, 100, 150, 200, 300 µg As/l; Gewebeproben) kalibriert. Dabei konnte anhand der linearen Beziehung zwischen der Konzentration und Emissionsintensität eine Kalibrationsgerade aufgestellt werden ($R^2 \geq 0,99$), die eine Umrechnung der gemessenen Intensitäten in den Aufschlusslösungen in eine Konzentration (µg As/l) ermöglichte. Nach 10 gemessenen Aufschlüssen erfolgte eine automatische Rekalibration des Gerätes. Soweit die Abweichung des Anstieges der angeglichenen Kalibrationsgeraden gegenüber der vorigen Re-/Kalibration geringer war als 10 % wurde die Messung fortgesetzt. Andernfalls wurde erneut eine Kalibration durchgeführt. In einer Kontrollmessung mit einer

Arsenlösung bekannter Konzentration wurde stets nach der Re-/Kalibration die Genauigkeit der Messung kontrolliert.

Bei der errechneten mittleren Arsenkonzentration in den Proben durfte laut eigener Festlegung im Messbereich von 40 bis 100 µg As/l Aufschluss die Abweichung des jeweiligen Einzelwertes (der Doppelbestimmung) vom Mittelwert nicht größer sein als 10 %. Bei Konzentrationen ≥ 100 µg As/l Aufschluss durften die Einzelwerte der Arsenkonzentrationen der Proben nicht mehr als 5 % vom Mittelwert abweichen. Gegebenenfalls wurde die Messung wiederholt. Bei der Messung der Arsenkonzentrationen in den Kotproben aus dem Versuch zur Abreicherung von Arsen wurden die aufgestellten Grenzen für den Messfehler zwar in einigen Fällen trotz Wiederholung der Messung überschritten, die Werte wurden aber dennoch genutzt, da hier die Ursache der Schwankungen in der Probenmatrix an sich vermutet wurde bzw. auf Bestandteile im Probenmaterial zurückzuführen sein könnte, die die Messung störten (z.B. Silikat).

Die sichere Quantifizierungsgrenze für Arsen wurde für das ICP-OES auf 40 µg As/l festgelegt. Dies entspricht 0,4 mg As/kg Probenmaterial bei einer Einwaage von 0,5 g. Bei geringeren Arsengehalten traten sowohl hohe Abweichungen zwischen den analysierten Arsenkonzentrationen der Doppelbestimmung auf, als auch große Streuungen zwischen den wiederholten Messungen eines Aufschlusses (Tab. A17). Bei analysierten Arsenkonzentrationen im Bereich unter 40 µg As/l wurden dieselben Aufschlüsse ein weiteres Mal gemessen. Betrag der Mittelwert der insgesamt 4 Messungen ≥ 15 µg As/l (entspricht ungefähr der messtechnischen Nachweisgrenze), so wurde dieser Wert für die weiteren Kalkulationen eingesetzt. Eine entsprechende Kennzeichnung dieser Proben befindet sich stets in der Ergebnisdarstellung. Lag der Mittelwert < 15 µg As/l galt das Arsen in der Probe als „nicht nachweisbar“.

Zur Erfassung des Messfehlers wurde eine Standardreihe über 13 Konzentrationsstufen einer Arsenlösung hergestellt und in 10facher Wiederholung jeweils einzeln und in aufsteigender Konzentration gemessen (mit Kontroll- und Rekalibrierungsmessung; Tab. A17). Die Kalibration des Gerätes erfolgte hier mit einer Konzentrationsreihe im Bereich von 0 bis 300 µg As/l.

In einigen Fällen konnte aufgrund eines Mangels an Probenmaterial nur ein Aufschluss je Probe durchgeführt werden. Dieser wurde stets doppelt gemessen und ein Messfehler

innerhalb der oben beschriebenen Grenzen zugelassen. Bei der Darstellung der Ergebnisse weisen entsprechende Vermerke auf diese Proben hin.

Aufgrund des niedrigen Messbereiches wurde die Arsenkonzentration der aufgeschlossenen Serum- und Milchproben in Stuttgart (Hohenheim) an der Landesanstalt für landwirtschaftliche Chemie analysiert (VDLUFA-Methode 2.2.2.5; BASSLER, 2003). Dazu stand ein Quadrupol-Massenspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma (Elan 6000, Perkin Elmer, Sciex, Canada) zur Verfügung. Bei der Berechnung der Arsenkonzentrationen innerhalb der Doppelbestimmung wurde eine maximale relative Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert um 20 % geduldet, da die Arsenkonzentrationen auch hier häufig im unteren Messbereich lagen.

Die Übereinstimmung zwischen den Arsenkonzentrationen, gemessen am ICP-OES und ICP-MS war relativ hoch und somit eine Vergleichbarkeit bzw. Genauigkeit beider Messmethoden gegeben. Anhand von Grassilageaufschlüssen mit unterschiedlichen Arsenkonzentrationen wurde dies überprüft (Tab. A18).

8.4.6 Spezifische Enzymaktivitäten

8.4.6.1 Verwendete Chemikalien und Substrate

Von folgenden Firmen wurden die in den Analysen eingesetzten Substrate und Chemikalien bezogen:

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe: KCl, NaOH, MgCl₂ · 6H₂O

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim: 1,4-Dithiothreitol, Glukose, EDTA, NADH, NADP⁺, Phosphoenolpyruvat, ATP, ADP, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Laktat-Dehydrogenase (Fluka BioChemika)

AppliChem GmbH, Darmstadt: Imidazol, Tris

8.4.6.2 Aufbereitung der Gewebe

Die Gewebeproben wurden in Anlehnung an SOENGAS *et al.* (2006) aufbereitet. Eine Einwaage von ca. 500 mg noch tiefgefrorenem, fein mit einem Skalpell zerkleinertem Gewebe wurde nach Zugabe von 4,5 ml eisgekühltem Homogenisierungspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,6, 5 mM EDTA, 2 mM 1,4-Dithiothreitol, Protease-Inhibitor-Cocktail)

mittels einem Potter (Potter S, B. Braun, Biotech International, Melsungen) homogenisiert. Zur Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte anschließend eine Zentrifugation für 10 min bei 2000 g (Biofuge Fresco, Heraeus Instruments, Osterode). In einem letzten Schritt zur Abtrennung der Mitochondrien erfolgte eine nochmalige Zentrifugation für 40 min bei 16000 g. Alle Arbeiten fanden auf Eis bzw. unter Kühlung bei max. 4 °C statt. Die Enzymaktivitäten und der Proteingehalt wurden im Homogenat ermittelt (siehe folgende Kapitel).

Dithiothreitol ist in der Lage, reduzierend zu wirken (CLELAND, 1964). Der Mechanismus der Hemmung von Enzymen durch Arsen besteht jedoch in der Bindung von Arsen an Thiolgruppen des Cysteins. Durch eine Reduktion dieser oxidierten Gruppen durch Dithiothreitol während der Aufbereitung der Gewebeproben könnten Enzyme möglicherweise wieder reaktiviert worden sein. Die Theorie dieses unerwünschten Einflusses des Dithiothreitols wurde aber überprüft und konnte abgelehnt werden.

8.4.6.3 Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40)

Die Messung der Pyruvatkinaseaktivität erfolgte mittels eines gekoppelten enzymatischen Tests. Dabei wird Phosphoenolpyruvat durch die Pyruvatkinase zu Pyruvat umgesetzt, welches in einer Folgereaktion durch die Laktat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27) unter Verbrauch von NADH zu Laktat umgebaut wird (Abb. 7). Die Abnahme von NADH wurde spektralphotometrisch (Amersham Biosciences, Ultrospec 3300 Pro, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 340 nm mittels Extinktionsmessung bei Raumtemperatur (22 °C) erfasst. Die Steuerung des Spektralphotometers erfolgte PC-gestützt durch das Programm Swift II, Reaction Kinetics (Version 2.05).

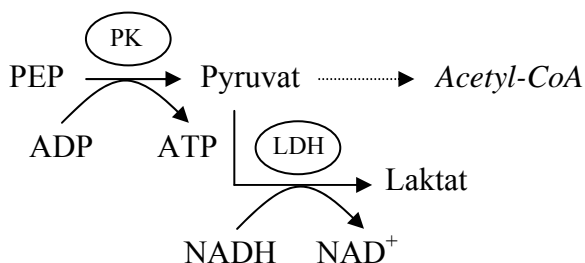


Abbildung 7: Schema der enzymatischen Reaktion zur Bestimmung der Pyruvatkinaseaktivität

PEP – Phosphoenolpyruvat, PK – Pyruvatkinase, LDH – Laktat-Dehydrogenase

Der Reaktionspuffer zur Messung der Aktivität der Pyruvatkinase war folgendermaßen zusammengesetzt (nach LUSHCHAK *et al.*, 2001):

50 mM Imidazol/HCl, pH 7,0

5 mM MgCl₂ · 6H₂O

50 mM KCl

10 mM PEP

2,5 mM ADP

0,15 mM NADH

Im Endvolumen von 1 ml waren zudem 0,5 U Laktat-Dehydrogenase enthalten. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Homogenates gestartet (Leber: 10 µl, Niere: 5 µl, Muskel: 3 µl). Die Abnahme der Extinktion wurde innerhalb eines Organs stets in ein und demselben repräsentativen Zeitraum (äußerste Linearität des Anstieges, maximale Aktivität) ermittelt. Es wurde jeweils eine 3-fach-Bestimmung durchgeführt und nachfolgend eine Korrektur der Extinktionen um den Blindwert vorgenommen, der durch Einsatz eines äquivalenten Volumens an Homogenisierungspuffer anstelle des Homogenates bestimmt wurde. Die relative Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert durfte maximal 10 % betragen (andernfalls erfolgte eine Messwiederholung), lag jedoch in den meisten Fällen unter 5 %. Die Proportionalität zwischen Enzymmenge und gemessener Enzymaktivität wurde in allen Geweben anhand einer Verdünnungsreihe belegt (Abb. A1).

8.4.6.4 Hexokinase (EC 2.7.1.1)/Glukokinase (EC 2.7.1.2)

Die Aktivität der Hexokinase bzw. der Glukokinase wurde über folgende Reaktion ermittelt (Abb. 8):

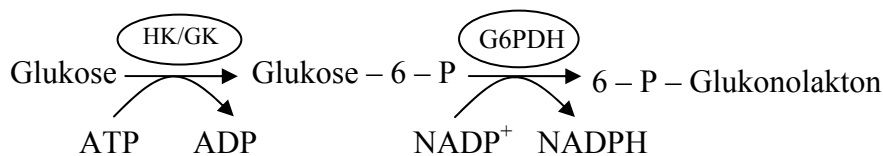


Abbildung 8: Schema der enzymatischen Reaktion zur Bestimmung der Hexokinase- bzw. Glukokinaseaktivität

HK – Hexokinase, GK – Glukokinase, Glukose-6-P – Glukose-6-Phosphat, G6PDH – Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-P-Glukonolaktone – 6-Phospho-Glukonolaktone

Glukose wird durch die Hexokinase (bzw. Glukokinase) unter Verbrauch von ATP phosphoryliert zu Glukose-6-Phosphat. Anschließend wird dieses in einer gekoppelten Indikatorreaktion durch die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49) unter Reduzierung von NADP^+ zu 6-Phospho-Glukonolakton umgebaut. Die Zunahme von NADPH über die Zeit wurde mittels Extinktionsmessung spektralphotometrisch bei 340 nm und Raumtemperatur (22 °C) verfolgt. Dessen Synthese verhält sich proportional zur Glukosephosphorylierung und dient daher als Indikator der Hexokinase- bzw. Glukokinasekatalysierten Reaktion.

Auch der hier eingesetzte Reaktionspuffer wurde nach LUSHCHAK *et al.* (2001) hergestellt und war folgendermaßen zusammengesetzt:

50 mM Imidazol/HCl, pH 7,0

5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

10 mM Glukose

0,2 mM NADP^+

2 mM ATP

Im Endvolumen von 1 ml waren 0,5 U Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase enthalten. Die Reaktion wurde wiederum durch die Zugabe des Homogenates (50 μl) gestartet und die Extinktion innerhalb eines Organs in ein und demselben Zeitraum ermittelt. Es wurde ebenfalls eine 3-fach-Bestimmung durchgeführt und nachfolgend eine Korrektur der Extinktionen um den Blindwert. Die relative Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert wurde aufgrund höherer Schwankungen innerhalb einer 3-fach-Bestimmung auf maximal 15 % festgesetzt, betrug in den meisten Fällen jedoch weniger als 10 %.

Die Proportionalität zwischen Enzymmenge und gemessener Enzymaktivität wurde wiederum in allen Geweben anhand einer Verdünnungsreihe überprüft (Abb. A2). Auch hier war das R^2 annähernd 1.

8.4.6.5 Berechnung der spezifischen Enzymaktivitäten

Die Enzymaktivitäten wurden nach folgender Formel berechnet (7):

$$\text{spezifische Aktivität (U/mg)} = \frac{\Delta E/\text{min} \cdot \text{Gesamtvolumen}}{\varepsilon \cdot d \cdot \text{Probenvolumen} \cdot c_{\text{Protein}}} \quad (7)$$

$\Delta E/\text{min}$ – Extinktionsänderung pro Minute (min^{-1})
 ε – Extinktionskoeffizient ($\text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
 D – Schichtdicke der Küvette (cm)
 c_{Protein} – Proteinkonzentration im Homogenat ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)

Der Extinktionskoeffizient von NADH beträgt $6,22 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ und von NADPH $6,3 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. 1 U bezeichnet die Menge an Enzymen, die 1 μmol Substrat in der Minute umsetzen.

8.4.6.6 Proteinbestimmung

Zur Ermittlung des Proteingehaltes wurde die von BRADFORD (1976) entwickelte Methode angewandt (Abb. A3). Der Nachweis beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 vorrangig an Argininreste und damit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 365 nm auf 595 nm. Die Extinktion der gebildeten Protein-Farbkomplexe wurde spektralphotometrisch erfasst (Spectrafluor Plus, Tecan, Männedorf, Schweiz; Programm: easyWINfitting Version V6.1).

Anhand einer zuvor erstellten Eichkurve definierter Proteinkonzentrationen einer Verdünnungsreihe (0; 10; 20; 40; 60; 80; 100 $\mu\text{g/ml}$) bovinen Serumalbumins (BSA) konnten die Proteinkonzentrationen in den Proben errechnet werden. Zuvor erfolgte eine Verdünnung der Proben, sodass die gemessene Konzentration innerhalb der Konzentrationen der Kalibriergeraden lag.

Je Kavität wurden 50 μl des verdünnten Homogenates bzw. der BSA-Verdünnungen in eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit 200 μl Bradford-Reagenz versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Extinktion.

Die Messung erfolgte als Doppelbestimmung und die Einzelwerte durften eine relative Abweichung von 10 % vom Mittelwert nicht überschreiten. Die Abweichung lag jedoch in den meisten Fällen unter 5 %.

8.4.6.7 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Enzymaktivitäten erfolgte unter Nutzung des Programmes SAS 9.1. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen (Arsen vs. Kontrolle) wurden in

den Organen der Mutterschafe zum Zeitpunkt der Ablammung, sowie 8 Wochen p.p. und in den Organen der Lämmer zusätzlich zum Zeitpunkt 4 Wochen p.p. mittels einem t-Test bei einem $P \leq 0,05$ identifiziert.

Mit der Prozedur *glm* wurde in einem Vergleich aller 8 Wochen alten Lämmer (reguläre Behandlung und „cross-over“-Behandlung der Kontroll- und Arsengruppe) überprüft, ob die Behandlung einen signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivitäten in den einzelnen Organen hatte. Signifikante Unterschiede wurden mittels eines Tukey-Kramer-Tests bei einem P-Wert $\leq 0,05$ gesichert.

8.4.7 Proteingehalt in der Frischmasse

Da die Aktivität der Enzyme auf den Proteingehalt in der Probe bezogen wurde, könnten auftretende Unterschiede in den Aktivitäten nicht primär aus einer tatsächlichen Aktivitätsveränderung der Enzyme resultieren, sondern sekundär auch Ergebnis eines veränderten Proteingehaltes im Gewebe sein. Ob die Arsenzulage einen Einfluss auf den Proteingehalt in den Geweben nahm, wurde daher überprüft.

Dazu wurde die Methode von SMITH *et al.* (1985) herangezogen. Eine Einwaage von ca. 500 mg zerkleinerter Frischmasse wurde in 5 ml 2 M NaOH mit einem Messerhomogenisator (Ultraturrax T25, Janke und Kunkel, IKA[®]-Labortechnik, Staufen) bei einer Leerlaufdrehzahl von 13500/min für 10 s homogenisiert, mit 5 ml 2 M NaOH aufgefüllt (dieses Volumen diente der Spülung des Messerhomogenisators) und 24 h im „end over end“-Verfahren bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte eine Auffüllung der Proben mit 2 M NaOH auf 12 ml. Ein Aliquot daraus wurde entnommen, 5 min bei 16000 g zentrifugiert (zur Abtrennung geringfügiger unlöslicher Rückstände) und ein Teil des Überstandes 1:10 verdünnt, um eine Messung des Proteingehaltes nach dem BCA Protein Assay durchzuführen. Dieser Test basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch das Protein, wobei nachfolgend das Cu^+ selektiv durch colorimetrische Detektion mittels Absorptionsmessung erfasst wird.

Dazu wurde vorerst ein Anteil 4 %ige CuSO_4 -Lösung mit 50 Anteilen BCA Reagenz A (BCA Protein Assay Kit, Pierce, Rockford, USA) vereint. 25 μl der verdünnten Probe wurde mit 200 μl dieses Reagenzes versetzt. Parallel wurde eine Standardreihe (0, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 und 2000 $\mu\text{g/ml}$) mit BSA zur Erstellung einer Kalibrierungsgeraden angesetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei 37 °C und

anschließender Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte die Messung der Absorption des Farbkomplexes bei 550 nm. Es wurde jeweils eine 3-fach-Bestimmung durchgeführt und eine relative Abweichung vom Mittelwert von 5 % nicht überschritten.

8.4.7.1 Statistische Auswertung

Die Überprüfung signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen („Arsen“ und „Kontrolle“) erfolgte analog der Auswertung der Enzymaktivitäten.

9 *In vivo*-Studien: Ergebnisse

9.1 Verdaulichkeitsversuch

9.1.1 Verdaulichkeit der Rohnährstoffe

In der Variante mit Arsen konnten nur die Daten von 3 Hammeln zur Auswertung herangezogen werden, da die Futteraufnahme eines Tieres sehr gering war. Die Arsenzulage hatte kaum Auswirkungen auf die Verdaulichkeiten der Rohnährstoffe (Tab. 15, Tab. A19). Lediglich die Verdaulichkeit der Rohfaser war in der Gruppe mit der Arsenzulage signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Im Mittel wurden in der Kontrollgruppe 63 % und in der Arsengruppe 64 % der organischen Substanz verdaut.

Tabelle 15: Verdaulichkeit der Rohnährstoffe, der Faserfraktionen und der stickstofffreien Extraktstoffe einer Ration ohne („Kontrolle“) oder mit („Arsen“) Arsentrioxid im Konzentratfutter im Versuch mit Hammeln (%; Mittelwert und Standardabweichung)

Gruppe	n	OS	XP	XL	XF	ADF	NDF	NfE
Kontrolle	4	63	66	69	55 ^a	54	55	67
		0,5	1,6	2,7	0,7	0,8	1,5	1,5
Arsen	3	64	66	70	57 ^b	53	55	68
		1,0	1,8	1,3	1,7	0,8	2,1	1,6

OS – organische Substanz, XP – Rohprotein, XL – Rohfett, XF – Rohfaser, ADF – saure Detergenzienfaser, NDF – neutrale Detergenzienfaser, NfE – stickstofffreie Extraktstoffe

^{a,b} unterschiedliche Hochbuchstaben in einer Spalte kennzeichnen signifikante Differenzen zwischen den Varianten laut t-Test ($P \leq 0,05$)

9.1.2 Arsenausscheidung

Der größte Teil des aufgenommenen Arsens wurde mit dem Kot wieder ausgeschieden (Tab. 16 und A20). Die tägliche Arsenausscheidung mit dem Harn lag in der Kontrollgruppe bei 35 bis 45 μg bei Konzentrationen von 30 bis 73 $\mu\text{g As/kg}$. In der Arsengruppe betrug die tägliche Arsenausscheidung über Harn durchschnittlich 2,3 mg bei Konzentrationen von 1,2 bis 5,8 mg As/kg (in Abhängigkeit vom Harnvolumen). In der Gegenüberstellung der Aufnahme und Ausscheidung von Arsen wurden rechnerisch geringfügige Differenzen ermittelt. Zur Auswertung dieses Versuches (und auch für Kapitel 9.1.3)

wurden wiederum alle Tiere der Arsengruppe herangezogen, da das Konzentratfutter und damit auch das Arsen vollständig aufgenommen wurden.

Tabelle 16: Arsenaufnahme und –ausscheidung bei der Verabreichung einer Ration ohne („Kontrolle“) oder mit („Arsen“) Arsentrioxid im Konzentratfutter im Versuch mit Hammeln (mg As/d; Mittelwert und Standardabweichung; n=4)

Gruppe	Aufnahme ⁺	Ausscheidung		Differenz
		Harn	Kot	
Kontrolle	0,12	0,04	0,14	-0,06
	0	0,005	0,031	0,028
Arsen	12,28	2,26	9,25	0,76
	0,003	0,228	1,427	1,317

⁺ Arsenmenge aus dem Futter korrigiert um die Arsenmenge in den Futterresten

9.1.3 Arsenabreicherung

Nach dem Entzug von arsenhaltigem Konzentrat wurde innerhalb von 6 Tagen ein großer Teil des Arsens wieder ausgeschieden (Abb. 9, Tab. A21). Dabei ist ersichtlich, dass ab dem ersten Zeitpunkt der Beprobung (bei 0 h) die Arsenkonzentration im Kot während der folgenden 18 h absank und dann innerhalb weiterer 12 h wieder leicht anstieg (Peakzeit bei ca. 30 h). Anschließend fiel die Arsenkonzentration erneut ab, bis 282 h (ca. 12 Tage) nach Beginn der ersten Fütterung ohne Arsenzulage kaum noch Arsen im Kot nachgewiesen werden konnte.

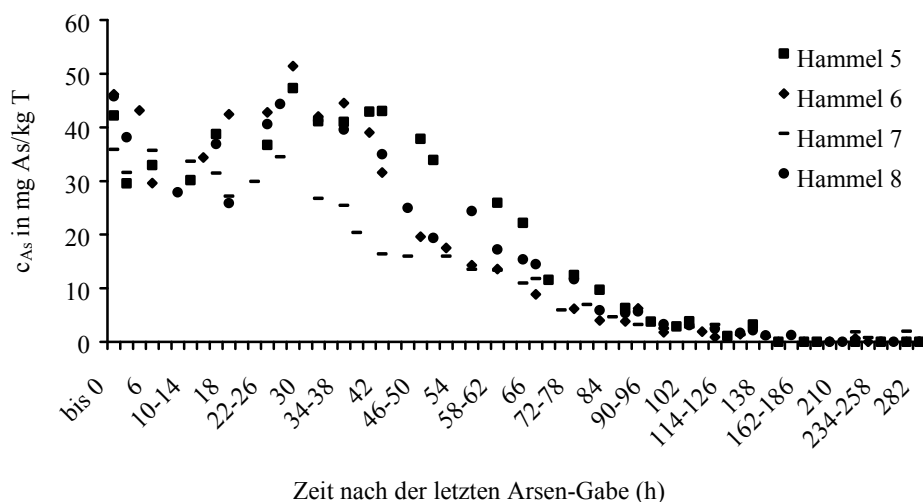


Abbildung 9: Arsenkonzentration (c_{As}) in Kotproben von Hammeln, beprobte in einem Zeitraum von 282 h nach Absatz (Zeitpunkt „0“) von arsenhaltigem Futter

Die Arsenkonzentration der Kotsammelprobe der Hammel der Arsengruppe im Verdaulichkeitsversuch entsprach hier dem Zeitpunkt „bis 0 h“. Die Unterschiede in den Arsenkonzentrationen der ein und derselben Sammelprobe zwischen dem Versuch zur Abreicherung und dem Verdaulichkeitsversuch begründet sich in den bereits erwähnten unterschiedlichen Analysen in verschiedenen Institutionen (siehe Kapitel 8.4.4).

9.2 Verbleib von Arsen in Mutterschafen und Lämmern

9.2.1 Leistungsdaten

Die Mutterschafe hatten zu Versuchsbeginn eine mittlere Lebendmasse von 63 kg in der Kontrollgruppe und 67 kg in der Arsengruppe (Tab. 17). Zwölf Wochen nach Versuchsbeginn hatte bereits ein Teil der Mutterschafe abgelammt, sodass in der Tabelle eine getrennte Betrachtung der Lebendmassen der noch trächtigen und bereits laktierenden Mutterschafe erfolgte. Schwankungen in der mittleren Lebendmasse der Mutterschafe zwischen den Gruppen begründen sich einerseits in tierindividuellen Unterschieden und andererseits in der Streuung der Ablammungszeitpunkte um den Termin der Wägung. Am Ende des Versuches lagen die mittleren Lebendmassen der Mutterschafe in der Kontroll- und Arsengruppe bei jeweils 71 bzw. 66 kg.

Tabelle 17: Mittlere Lebendmassen (kg) der Mutterschafe im Versuchszeitraum (Mittelwert und Standardabweichung)

Gruppe	Versuchs- beginn	Wochen nach Versuchsbeginn					
		4	8	12 ⁺	12 [*]	16	20
Kontrolle	63	64	71	76	67	65	71
	8,8	8,4	8,1	11,4	3,4	9,4	6,8
	(n=12)	(n=12)	(n=12)	(n=5)	(n=4)	(n=9)	(n=6)
Arsen	67	67	75	82	68	66	66
	4,3	4,2	3,4	#	5,3	4,7	5,2
	(n=12)	(n=11)	(n=11)	(n=2)	(n=6)	(n=7)	(n=4)

⁺ nur trächtige Tiere

^{*} nur laktierende Tiere

[#] da n=2 Berechnung einer Standardabweichung nicht möglich

Die Ablammungstermine lagen in einem Zeitraum von fast 5 Wochen. Tiere der Kontrollgruppe lammten innerhalb eines Zeitraumes von 33 Tagen, die Tiere der

Arsengruppe in einer Zeitspanne von 29 Tagen. Ein Mutterschaf der Arsengruppe wurde aufgrund der sehr frühen Ablammung aus dem Versuch ausgeschlossen. Ein weiteres Muttertier verendete ohne erkennbaren Grund 12 Wochen nach Versuchsbeginn bzw. 16 Tage nach der Ablammung. Die 2 verbliebenen Lämmer wurden ebenfalls nicht in die Versuchsauswertung einbezogen.

Zudem wurde ein Lamm tot geboren und 2 weitere Lämmer verendeten kurz nach der Geburt, vermutlich durch das Einwirken des Muttertieres. Das Geburtsgewicht der Einzellämmer (n=7) in der Kontrollgruppe betrug im Mittel 6200 g, das der Zwillingslämmer 4800 g (n=7; ein bereits im Mutterleib verendetes und unterentwickeltes Zwillingslamm wurde nicht in die Berechnung einbezogen). In der Arsengruppe lag das mittlere Geburtsgewicht der Einzellämmer (n=5) bei 6100 g und bei den Zwillingslämmern (n=12) bei 4500 g. Die mittlere Lebendmasse 8 Wochen p.p. betrug in der Kontrollgruppe (n=5) 24 kg und in der Arsengruppe (n=6) 25 kg. Insgesamt gingen 14 weibliche und 15 männliche Lämmer, darunter 18 Zwillingslämmer, in den Versuch ein.

9.2.2 Blutparameter

Die Werte aller untersuchten Blutparameter lagen im Normbereich für Schafe (Tab. 18). Der Erythrocyten-, Leukocyten- und Hämoglobingehalt des Blutes lag im Mittel jeweils bei 9 bis 11 T/l ($T = 10^{12}$), 5,6 bis 7,2 G/l ($G = 10^9$) und 101 bis 123 g/l.

Der Faktor „Versuchsdauer“ (entspricht dem Zeitfaktor) hatte in der Kontrollgruppe einen signifikanten Einfluss auf den Gehalt der Erythrocyten. 4 Wochen nach Versuchsbeginn war deren Gehalt signifikant höher als 8 und 12 Wochen danach. 16 und 20 Wochen nach Versuchsbeginn stieg der Gehalt wiederum annähernd auf die Höhe des Ausgangsniveaus. In der Arsengruppe hatte die Versuchsdauer keinen signifikanten Einfluss auf den Erythrocytengehalt. Gleiche Tendenzen im Anstieg und Abfall des Gehaltes im Zeitverlauf analog der Kontrollgruppe waren jedoch erkennbar. Unterschiede zwischen den Gruppen existierten nicht.

Tabelle 18: Erythrocyten-, Leukocyten-, Hämoglobingehalt und Hämatokrit bei Mutter-schafen im Versuchszeitraum (Mittelwert und Standardabweichung)

Gruppe	Wochen nach Versuchsbeginn					Referenzwert ⁺
	4	8	12	16	20	
<i>Erythrocyten (T/l)</i>						
Kontrolle [*]	10,8 ^c 1,46	9,4 ^a 1,30	9,7 ^{ab} 1,28	10,5 ^{bc} 0,88	10,5 ^{bc} 0,91	7,3 - 11,3
Arsen [#]	10,6 0,63	9,7 1,06	9,9 1,31	10,2 0,76	10,3 0,84	
<i>Leukocyten (G/l)</i>						
Kontrolle [*]	6,0 ¹ 0,59	5,6 ¹ 1,27	6,4 0,76	6,4 0,85	5,8 0,85	4,0 - 10,0
Arsen [#]	7,2 ² 1,37	7,0 ² 1,25	7,2 1,92	7,0 1,49	7,1 1,97	
<i>Hämoglobin (g/l)</i>						
Kontrolle [*]	119 ^b 12,4	101 ^a 16,3	111 ^{ab} 10,3	116 ^b 9,2	122 ^b 9,9	80 - 120
Arsen [#]	123 ^b 8,2	111 ^a 13,2	115 ^{ab} 10,3	115 ^{ab} 9,6	115 ^{ab} 9,7	
<i>Hämatokrit (l/l)</i>						
Kontrolle [*]	0,33 ^c 0,035	0,26 ^a 0,028	0,28 ^b 0,018	0,30 ^b 0,022	0,33 ^c 0,029	0,29 - 0,38
Arsen [#]	0,33 ^c 0,020	0,28 ^a 0,025	0,30 ^b 0,035	0,29 ^{ab} 0,021	0,31 ^{abc} 0,021	

⁺ nach Vorgabe des Analysenlabors

^{*} 4 und 8 Wochen nach Versuchsbeginn – n=12; 12 und 16 Wochen – n=9; 20 Wochen – n=6

[#] 4 und 8 Wochen nach Versuchsbeginn – n=12; 12 Wochen – n=9; 16 Wochen – n=7; 20 Wochen – n=4

^{a,b,c} unterschiedliche Hochbuchstaben in einer Zeile kennzeichnen signifikante Differenzen zwischen den Zeitpunkten der Beprobung laut Tukey (P ≤ 0,05)

^{1,2} unterschiedliche Hochzahlen in einer Spalte kennzeichnen signifikante Differenzen zwischen den Varianten laut Tukey (P ≤ 0,05)

Ein hochsignifikanter Effekt der Arsenaufnahme wurde dagegen auf den Leukocytengehalt festgestellt. Zu den Zeitpunkten 4 und 8 Wochen nach Beginn des Versuches waren die Unterschiede zwischen beiden Gruppen signifikant. Dabei lag der Gehalt in der Arsen-Gruppe im gesamten Versuchszeitraum auf einem höheren Niveau. Ein Einfluss der Zeit bzw. Versuchsdauer existierte nicht. Auf den Hämoglobingehalt hatte diese wiederum, diesmal in beiden Gruppen, einen hochsignifikanten Einfluss (P=0,0002). Der Abfall des

Gehaltes von der 4. auf die 8. Versuchswoche war in beiden Gruppen signifikant. In der Kontrollgruppe stieg der Hämoglobingehalt im Versuchsverlauf jedoch wieder signifikant an, in der Arsengruppe nur geringfügig. Die Aufnahme von Arsen führte dagegen nicht zu Veränderungen im Hämoglobingehalt gegenüber der Kontrollgruppe.

Der Hämatokritwert lag im Mittel mit 0,26 bis 0,33 im unteren Normbereich. Die Aufnahme von Arsen führte zwar zu den Beprobungszeitpunkten 8 und 12 Wochen nach Versuchsbeginn zu tendenziell höheren Werten, jedoch nicht zu signifikanten Unterschieden gegenüber der Kontrolle. Allerdings hatte wiederum die Versuchsdauer in beiden Gruppen einen hochsignifikanten Einfluss. Von der 4. auf die 8. Versuchswoche fiel der Hämatokritwert in beiden Gruppen signifikant ab und stieg bis zum Ende des Versuches wieder an.

9.2.3 Arsenkonzentrationen

Die Darstellung von mittleren Arsenkonzentrationen der beprobten Gewebe ist insofern nicht exakt, da auf Ebene der Einzeltiere neben den sicher ermittelten Gehalten in Doppelbestimmungen auch Werte aus wiederholt gemessenen Einzelaufschlüssen vorlagen. Daneben wurden Arsenkonzentrationen unterhalb der sicheren Quantifizierungsgrenze (40 µg As/l) gemessen, bei denen durch eine Messwiederholung nur eine Annäherung an einen Konzentrationsbereich möglich war. Dennoch wurden alle ermittelten Arsenkonzentrationen auf Einzeltierbasis bei der Berechnung des mittleren Arsengehaltes des jeweiligen Gewebes berücksichtigt. Die statistische Auswertung schien jedoch aus genannten Gründen der Ungleichheit der Messungen (Anzahl Wiederholungen, Höhe des Fehlers) unangebracht. Die tabellarische Auflistung der Arsenkonzentrationen in den Geweben in der Einzeltierdarstellung enthält stets entsprechende Hinweise auf Abweichungen in der Art der Messwiederholung und des Messfehlers (siehe auch 8.4.5):

- Messwert unterhalb der sicheren Quantifizierungsgrenze (< 40 µg As/l Aufschluss)
- Messwert aus wiederholt gemessenem, einzelner Aufschluss einer Probe mit Messfehler innerhalb der festgelegten Grenze
- Messwert aus wiederholt gemessenem, einzelner Aufschluss einer Probe mit Messfehler außerhalb der festgelegten Grenze
- Messfehler der Doppelbestimmung außerhalb der festgelegten Grenze

Messwerte ohne zusätzliche Erläuterung wurden als Doppelbestimmung gemessen und unterlagen einem Fehler innerhalb der aufgestellten Grenzen. Diese Fehlergrenzen galten ebenfalls für wiederholt gemessene Einzelbestimmungen. Alle Einzelwerte der analysierten Arsenkonzentrationen können den Anhangstabellen A22 bis A25 entnommen werden.

9.2.3.1 Arsenkonzentrationen – Mutterschafe

Serum

Zu Versuchsbeginn lag die mittlere Arsenkonzentration im Serum aller Mutterschafe bei 4,8 µg As/l und variierte in der Kontrollgruppe im Laufe des gesamten Versuches nur geringfügig (Tab. 19, Tab. A22). In der Arsengruppe wurde 4 Wochen nach Versuchsbeginn eine um den Faktor 10 höhere Arsenkonzentration als zu Versuchsbeginn im Serum analysiert, die – unabhängig von der Höhe der absolut aufgenommenen Arsenmenge und der Arsenkonzentration in der Ration – im Versuchsverlauf in einem Bereich von 27,3 bis 59,8 µg As/l schwankte.

Tabelle 19: Mittlere Arsenkonzentration im Blutserum der Mutterschafe beider Versuchsgruppen (µg As/l; Mittelwert und Standardabweichung)

Gruppe	Versuchs- beginn	Wochen nach Versuchsbeginn				
		4	8	12	16	20
Kontrolle	4,9	6,3	7,5	4,9	5,7	8,6
	0,79	1,58	1,00	0,88	0,68	1,20
	(n=10)	(n=11)	(n=9)	(n=9)	(n=7)	(n=7)
Arsen	4,6	46,2	39,9	35,7	59,8	27,3
	0,36	6,91	3,90	5,66	10,50	13,59
	(n=10)	(n=7)	(n=10)	(n=8)	(n=7)	(n=5)

Wolle und Horn

In den Woll- und Hornproben der Kontrollgruppe konnte kein Arsen nachgewiesen werden, da die Konzentrationen unterhalb der messtechnischen Nachweisgrenze lagen (Tab. A23). Bei zwei Tieren wurde lediglich zu Beginn des Versuches eine geringfügige Arsenkonzentration (0,2 und 0,3 mg As/kg T) im Horn analysiert.

Für die Tiere der Arsengruppe wurde über den Versuchszeitraum ein kontinuierlicher Anstieg der Arsenkonzentration in Wolle und Horn festgestellt (Abb. 10).

In der Wolle konnte eine mittlere Anreicherung von bis zu 4,1 mg As/kg fettfreie T und im Horn bis zu 3,3 mg As/kg T nach einer 20-wöchigen Arsenapplikation nachgewiesen werden. Die Arsenkonzentrationen in der Wolle unterlagen teilweise starken Schwankungen.

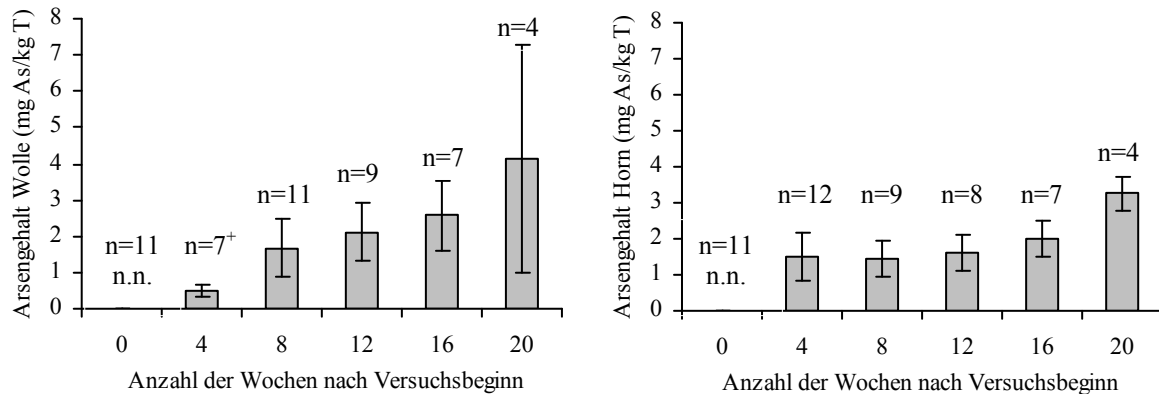


Abbildung 10: Arsenkonzentration in fettfreier Wolle und Horn der Mutterschafe mit Arsensupplementierung

n.n. – nicht nachweisbar

⁺ in 5 weiteren Proben war kein Arsen nachweisbar; diese blieben bei der Mittelwertberechnung unberücksichtigt

Muskel, Niere, Leber

In den Gewebeproben der Tiere ohne Arsensupplementierung konnte kein Arsen nachgewiesen werden (Tab. 20). Sowohl die Mutterschafe der Arsengruppe, die zum abblammungsnahen Termin beprobt wurden, als auch die 8 Wochen nach der Ablammung beprobten Mutterschafe der Arsengruppe akkumulierten Arsen mit bis zu 1,1 mg As/kg T am stärksten im Nierengewebe. Die Höhe der Akkumulation im Muskel und in der Niere zur Probennahme 8 Wochen nach der Ablammung war nominal höher als zum Zeitpunkt der Ablammung, an dem die Arsenkonzentration im Muskel nur in einem der drei Fälle die Nachweisgrenze überschritt. Mit 0,4 bis 0,5 mg As/kg T unterschied sich der Gehalt in der Leber zu beiden Terminen nicht.

Tabelle 20: Arsengehalte in Muskel, Niere und Leber von Mutterschafen zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns, der Ablammung und 8 Wochen nach der Ablammung (mg As/kg T; Einzeltierdaten)

Gruppe/Tier	Muskel	Niere	Leber	
<i>Versuchsbeginn</i>				
1				
2		n.n.		
3				
<i>Ablammung</i>				
Kontrolle	1			
	2		n.n.	
	3			
Arsen	1	n.n.	0,7 ⁺	0,4 ⁺
	2	0,3 ⁺	0,9	0,6 [*]
	3	n.n.	0,8 [*]	0,4 ⁺
<i>8 Wochen nach Ablammung</i>				
Kontrolle	1			
	2		n.n.	
	3			
Arsen	1	0,3 ⁺	1,1	0,3 ⁺
	2	0,4 ⁺	1,1	0,6 ⁺
	3	0,6	0,8 ⁺	0,6

n.n. – nicht nachweisbar

⁺ Messwert unterhalb der sicheren Quantifizierungsgrenze (< 40 µg As/l Aufschluss)

^{*} Messwert aus wiederholt gemessenem, einzeltem Aufschluss einer Probe (mit Messfehler innerhalb der festgelegten Grenze)

Plazenta

Es wurden insgesamt 21 Plazenten beprobt, 12 in der Kontroll- und 9 in der Arsengruppe, wobei in beiden Gruppen jeweils von 2 Muttertieren 2 Plazenten aus Zwillingsgeburten beprobt werden konnten (Tab. 21). Arsen konnte nur in Plazenten der Tiere der Gruppe mit Arsensupplementierung mit einem mittleren Gehalt von 2,6 mg As/kg T nachgewiesen werden.

Tabelle 21: Arsenkonzentration in den Plazenten der Mutterschafe (mg As/kg T; Einzeltierdaten)

Gruppe/Tier	Plazenta		
	1	2	
Kontrolle	n.n. ⁺	n.n.*	
Arsen	1	1,6	
	2	2,6	
	3	3,0	
	4	1,1	0,7
	5	2,9	
	6	7,6	2,8
	7	1,4	

n.n. – nicht nachweisbar

⁺ n=10

* n=2

Milch

Der Arsengehalt in der Kolostralmilch war in beiden Varianten gegenüber der reifen Milch wesentlich höher (Tab. 22, Tab. A22). Für die Tiere mit Arsensupplementierung wurde eine mittlere Arsenkonzentration von 27 µg As/l Kolostrum analysiert. Die großen Streuungen der Werte (von 3,6 bis 57,0 µg As/l) resultierten vermutlich aus den unterschiedlichen Zeitabständen zwischen der Ablammung und Beprobung des Kolostrums. In den Milchproben aus den nachfolgenden Probenahmen wurden mittlere Arsenkonzentrationen zwischen 5,3 und 7,6 µg As/l in der Arsengruppe gemessen. Die Milch der Tiere der Kontrollgruppe enthielt mittlere Arsenkonzentrationen von 1,1 bis 2,4 µg As/l.

Tabelle 22: Mittlere Arsenkonzentration im Kolostrum und in der reifen Milch der Mutterschafe beider Versuchsvarianten (µg As/l; Mittelwert und Standardabweichung)

Gruppe	Kolostrum	Beprobungstermine (2-wöchentlicher Abstand)				
		1.	2.	3.	4.	5.
Kontrolle	9,4	1,8	2,4	2,0 ⁺	1,5	1,1
	4,01	0,70	0,29	0,29	0,88	0,66
	(n=11)	(n=3)	(n=6)	(n=4)	(n=5)	(n=3)
Arsen	26,8	7,1	5,3	6,4	7,0	7,6
	18,27	4,33	1,50	3,44	2,72	0,52
	(n=11)	(n=6)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=3)

⁺ Arsenkonzentration war in einer Probe nicht nachweisbar (< 0,5 µg As/l) und wurde deshalb nicht in die Mittelwertberechnung einbezogen

9.2.3.2 Arsenkonzentrationen – Lämmer

Serum

Lämmer, die zeitnah zum Geburtszeitpunkt geschlachtet wurden, wiesen bereits deutliche Unterschiede in den Arsenkonzentrationen im Serum auf in Abhängigkeit der Gruppenzuordnung (2,9 vs. 5,5 µg As/l in der Kontroll- bzw. Arsengruppe; Tab. 23, Tab. A24). Im ersten Abschnitt der Säugephase lag die Arsenkonzentration im Serum der Tiere der Kontrollgruppe unter der Nachweisgrenze und bei den Lämmern der Arsengruppe im Mittel bei 3,5 µg As/l. Im Versuchsverlauf erhöhte sich die Arsenkonzentration im Serum der Tiere der Kontrollgruppe im Mittel auf bis zu 6,5 µg As/l. Für die Arsengruppe wurden im ersten Abschnitt der Säugephase zunächst leicht sinkende Arsengehalte im Serum dokumentiert. Die Aufnahme von arsenkontaminiertem Konzentratfutter mit Beginn der 5. Lebenswoche führte zu einem deutlichen Anstieg der Arsenkonzentration im Serum auf durchschnittlich 102 µg As/l. Zum Schlachttermin nach der 4-wöchigen Konzentrataufnahme wurde ein mittlerer Arsengehalt im Serum von 45,5 µg As/l analysiert.

Tabelle 23: Mittlere Arsenkonzentration im Serum der Lämmer in verschiedenen Lebensabschnitten (µg As/l; Mittelwert und Standardabweichung)

Gruppe	Geburt	während der Säugephase (4 – 14 d)	bis Ende der Säugephase (15 – 29 d)	Zufütterung bis Versuchsende	Versuchsende/Schlachtung
Kontrolle	2,9 0,76 (n=6)	n.n. ⁺ (n=5)	5,5 1,66 (n=5)	6,5 _# (n=2)	5,1 _# (n=2)
	<i>Aufnahme von arsenkontaminiertem Konzentrat von Woche 5 bis 8 p.p.</i>			62,0 [*] _# (n=2)	56,3 [*] _# (n=2)
	<i>(„cross-over“-Behandlung):</i>				
Arsen	5,5 0,71 (n=8)	3,5 0,45 (n=4)	6,1 2,03 (n=4)	102,1 [*] _# (n=2)	45,5 6,41 (n=3)
	<i>Aufnahme von nicht-arsenkontaminiertem Konzentrat von Woche 5 bis 8 p.p.</i>			7,0 1,57 (n=3)	6,6 0,18 (n=3)
	<i>(„cross-over“-Behandlung):</i>				

n.n. – nicht nachweisbar

⁺ 4 Messwerte unter der Nachweisgrenze, 1x 4,3 µg As/l

^{*} ein Ausreißerwert aufgrund mangelnder Konzentrataufnahme unberücksichtigt

[#] da n=2 Berechnung einer Standardabweichung nicht möglich

Die Aufnahme von unkontaminiertem Konzentratfutter von der 5. bis zur 8. Lebenswoche in der Arsengruppe in der „cross-over“-Behandlung führte zu keiner Veränderung der Arsenkonzentration im Serum gegenüber der Arsenkonzentration in der Säugephase. Lämmer der Kontrollgruppe, die wiederum ab der 5. bis zur 8. Lebenswoche arsenkontaminiertes Konzentratfutter erhielten, reagierten mit einer starken Erhöhung der Arsenkonzentration im Serum, die sich bis zum Zeitpunkt der Schlachtung nicht mehr veränderte.

Wolle und Horn

Zum Zeitpunkt der Ablammung konnte nicht ausreichend Probenmaterial an Wolle und Horn der Lämmer gewonnen werden, sodass eine Messung der Arsenkonzentrationen in diesen Geweben zu diesem Zeitpunkt nicht erfolgen konnte.

Bei der ersten Probennahme von Wolle und Horn wiesen die Lämmer der Arsengruppe unabhängig von deren Alter (3 bis 19 Tage) eine mittlere Arsenkonzentration von 0,6 mg As/kg T in der fettfreien Wolle sowie 2,2 mg As/kg T im Horn auf (Tab. A23). 4 Wochen später (zum 2. Probennahmetermin) erfolgte in der Arsengruppe bereits eine 9 bis 13tägige Konzentratfutteraufnahme (mit Arsen), was sich in einer Erhöhung des Arsengehaltes in der Wolle und im Horn gegenüber der ersten Probennahme widerspiegelte. In der fettfreien Wolle variierte der Arsengehalt zwischen 0,4 und 3,5 mg As/kg T und im Horn zwischen 2,7 und 3,9 mg As/kg T. Damit stieg die Arsenkonzentration im Mittel auf 1,9 bzw. 3,4 mg As/kg. Die Arsenkonzentration im Horn der Lämmer war generell höher als bei den Mutterschafen. Weder im Horn noch in der Wolle von Lämmern der Kontrollgruppe wurde Arsen nachgewiesen.

Bei den Lämmern der Arsengruppe, die ab der 5. Lebenswoche Konzentratfutter ohne Arsenzulage erhielten, konnte eine Abnahme der Arsenkonzentration in der Wolle belegt werden (Abb. 11). Eines dieser Lämmer konnte im Versuchsverlauf ein drittes Mal beprobt werden, wobei ein leichter Anstieg des Arsengehaltes (um 0,3 mg As/kg T) im Horn verzeichnet wurde. Dagegen reicherte sich in der Wolle von Lämmern der Kontrollgruppe, deren Konzentrat eine Arsenzulage enthielt („cross-over“-Behandlung), Arsen an. Diese Effekte waren im Horn weniger stark ausgeprägt (Abb. 12).

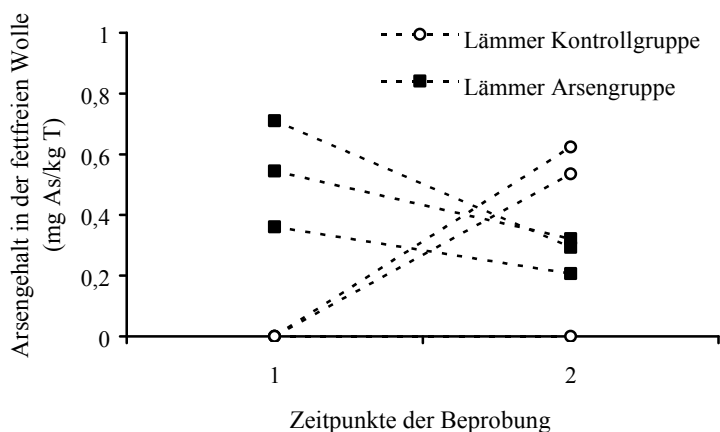


Abbildung 11: An- bzw. Abreicherung von Arsen in der Wolle von Lämmern nach der Umstellung auf das Konzentrat der jeweils anderen Variante („cross-over“-Behandlung) am Beispiel von Einzeltieren

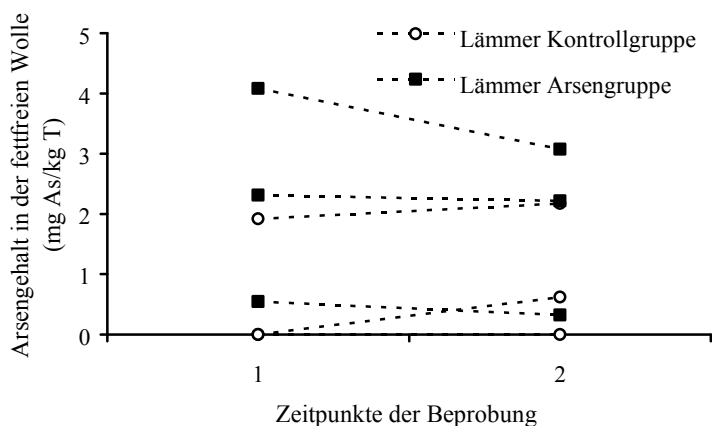


Abbildung 12: An- bzw. Abreicherung von Arsen im Horn von Lämmern nach der Umstellung auf das Konzentrat der jeweils anderen Variante („cross-over“-Behandlung) am Beispiel von Einzeltieren

Muskel, Niere, Leber

Die Arsenkonzentration im Muskel, in der Leber und der Niere zum Zeitpunkt der Geburt und im Alter von 4 Wochen war bis auf jeweils eine Ausnahme in beiden Gruppen nicht nachweisbar (Tab. A25). Auch bei den 8 Wochen alten Lämmern der Kontrollgruppe konnte hier kein Arsen analysiert werden. Ebenso war bei den Lämmern der Arsengruppe, die in der „cross-over“-Behandlung das Konzentrat der Kontrollgruppe erhielten, kein Arsen im Muskel, in der Leber und der Niere nachweisbar. Höhere Arsenkonzentrationen wurden dagegen in Muskel, Niere und Leber 8 Wochen alter Lämmer ermittelt, die entweder aus der Arsengruppe stammten oder aus der Kontrollgruppe und

arsenkontaminiertes Konzentratfutter über 4 Wochen aufgenommen hatten („cross-over“-Behandlung). Trotz unterschiedlich hoher Konzentrataufnahme der einzelnen Lämmer wurden ähnlich hohe Konzentrationen ermittelt (Muskel: bis 0,5 mg As/kg T, Niere: bis 1,5 mg As/kg T, Leber: bis 0,7 mg As/kg T).

9.3 Spezifische Enzymaktivitäten

9.3.1 Pyruvatkinase

Die mittlere Pyruvatkinaseaktivität in der Leber der Mutterschafe und Lämmer der Arsengruppe war zumeist höher gegenüber der Kontrollgruppe (Tab. 24 und 25, Tab. A28). Dieser Unterschied konnte für die Mutterschafe und Lämmer zum Zeitpunkt 8 Wochen nach der Ablammung, und bei den Lämmern zusätzlich 4 Wochen nach der Ablammung, statistisch gesichert werden. Auffällig war auch, dass in beiden Gruppen die Pyruvatkinaseaktivität in der Leber der 8 Wochen alten Lämmer höher war, wenn diese von der 5. bis zur 8. Lebenswoche arsenhaltiges Konzentratfutter aufnahmen. Signifikant war dieser Unterschied jedoch nicht.

Tabelle 24: Pyruvatkinaseaktivität in der Leber von Mutterschafen der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3)

Zeitpunkt	Kontrolle	Arsen	P-Wert
Versuchsbeginn	143 36,1		
Ablammung	107 20,1	121 8,5	0,316
8 Wochen p.p.	99 ^a 4,5	114 ^b 6,3	0,026

^{a,b} unterschiedliche Hochbuchstaben in einer Zeile kennzeichnen signifikante Differenzen zwischen den Varianten laut t-Test ($P \leq 0,05$)

Tabelle 25: Pyruvatkinaseaktivität in der Leber von Lämmern der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3)

Zeitpunkt	Kontrolle	Arsen	P-Wert
Geburt (als Zwilling)	124 12,0	149 20,6	0,153
Geburt (als Einzeltier)	162 27,4	144 11,5	0,343
Geburt (alle; n=6)	143 28,0	146 15,2	0,832
4 Wochen p.p.	111 ^{a+}	161 ^b 9,0	0,005
8 Wochen p.p.	116 ^A 12,2	150 ^B 1,4	0,014
8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung*)	141 ^{AB+}	135 ^{AB} 10,0	0,882

^{a,b} unterschiedliche Hochbuchstaben in einer Zeile kennzeichnen signifikante Differenzen zwischen den Varianten laut t-Test ($P \leq 0,05$)

^{A,B} unterschiedliche Kapitälchen kennzeichnen signifikante Differenzen laut Tukey-Kramer im Vergleich aller 8 Wochen alten Lämmer ($P \leq 0,05$; P-Werte können der Tab. A26 entnommen werden)

⁺ n=2, daher Berechnung einer Standardabweichung nicht möglich

* Lämmer der Kontrollgruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. arsenkontaminiertes Konzentrat, Lämmer der Arsengruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. nicht-arsenkontaminiertes Konzentrat

Bei den zur Geburt geschlachteten Zwillingslämmern war die Pyruvatkinaseaktivität in der Niere in der Kontrollgruppe signifikant höher als in der Arsengruppe (Tab. 26, Tab. A29). Die 8 Wochen alten Lämmer der Kontrollgruppe, die in der „cross-over“-Behandlung arsenhaltiges Konzentrat erhielten, wiesen einerseits eine signifikant höhere Pyruvatkinaseaktivität auf, als die 8 Wochen alten Lämmer der Kontrollgruppe ohne Arsenaufnahme, andererseits aber auch als die 8 Wochen alten Lämmer aus der Arsengruppe, die ebenfalls Arsen aufnahmen (Tab. 27). Die Pyruvatkinaseaktivität in der Arsengruppe (mit regulärer Behandlung) unterschied sich jedoch nicht von der Pyruvatkinaseaktivität der Tiere, die von der 5. bis zur 8. Lebenswoche kein Arsen aufnahmen. Bei den Mutterschafen waren die Unterschiede zwischen den ermittelten Pyruvatkinaseaktivitäten aufgrund hoher Standardabweichungen innerhalb einer Gruppe nicht sicherbar.

Tabelle 26: Pyruvatkinaseaktivität in der Niere von Mutterschafen der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3)

Zeitpunkt	Kontrolle	Arsen	P-Wert
Versuchsbeginn	681 79,8		
Ablammung	523 73,0	663 124,6	0,170
8 Wochen p.p.	669 26,6	733 134,3	0,467

Tabelle 27: Pyruvatkinaseaktivität in der Niere von Lämmern der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3)

Zeitpunkt	Kontrolle	Arsen	P-Wert
Geburt (als Zwillings)	1299 ^b 185,7	697 ^a 186,0	0,017
Geburt (als Einzeltier)	745 45,6	780 151,9	0,719
Geburt (alle; n=6)	1022 326,6	739 158,5	0,085
4 Wochen p.p.	924 ⁺	907 141,0	0,895
8 Wochen p.p.	662 ^A 24,0	705 ^{AB} 50,6	0,823
8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung*)	936 ^{C+}	780 ^{ABC} 54,2	0,098

^{a,b} unterschiedliche Hochbuchstaben in einer Zeile kennzeichnen signifikante Differenzen zwischen den Varianten laut t-Test ($P \leq 0,05$)

^{A,B} unterschiedliche Kapitalchen kennzeichnen signifikante Differenzen laut Tukey-Kramer im Vergleich aller 8 Wochen alten Lämmer ($P \leq 0,05$; P-Werte können der Tab. A26 entnommen werden)

⁺ n=2, daher Berechnung einer Standardabweichung nicht möglich

* Lämmer der Kontrollgruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. arsenkontaminiertes Konzentrat, Lämmer der Arsengruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. nicht-arsenkontaminiertes Konzentrat

Die Pyruvatkinaseaktivität im Muskel der Mutterschafe war in der Arsengruppe zwar höher, was aber wiederum aufgrund der tierindividuellen Unterschiede statistisch nicht gesichert werden konnte (Tab. 28, Tab. A30). Zum Zeitpunkt der Geburt der Lämmer war die Pyruvatkinaseaktivität im Muskel der Lämmer der Kontrollgruppe etwas höher im Vergleich zur Arsengruppe, jedoch ohne signifikanten Unterschied (Tab. 29). Die Lämmer

der Arsengruppe besaßen im Alter von 8 Lebenswochen sowohl nach Aufnahme des arsenkontaminierten Konzentrates, als auch nach Aufnahme des nicht-arsenkontaminierten Konzentratfutters (in der „cross-over“-Behandlung) eine gleiche Aktivität der Pyruvatkinase im Muskel. In der Kontrollgruppe war die Pyruvatkinaseaktivität nach Verzehr des arsenhaltigen Konzentrates (in der „cross-over“-Behandlung) höher als bei den 8 Wochen alten Lämmern der Kontroll- und Arsengruppe, die Konzentrat ohne Arsenzusatz aufnahmen, allerdings wiederum ohne signifikanten Unterschied.

Tabelle 28: Pyruvatkinaseaktivität im Muskel von Mutterschafen der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (U/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3)

Zeitpunkt	Kontrolle	Arsen	P-Wert
Versuchsbeginn	5,1 0,83		
Ablammung	4,4 2,13	6,5 2,04	0,288
8 Wochen p.p.	5,1 1,63	5,4 0,90	0,774

Diese Beobachtungen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Mutterschafe:

- Die Arsenzulage führte stets zu höheren Pyruvatkinaseaktivitäten in der Leber, Niere und im Muskel. Jedoch konnte der Unterschied nur in einem Fall (Leber; 8 Wochen p.p.) gesichert werden.

Lämmer:

- In der Leber der Lämmer war die Aktivität der Pyruvatkinase 4 und 8 Wochen nach der Geburt signifikant höher als in der Kontrollgruppe. In der Niere wurde zu diesen Zeitpunkten kein Unterschied zwischen den Pyruvatkinaseaktivitäten festgestellt. Die Pyruvatkinaseaktivität im Muskel war in der regulär behandelten Arsengruppe meist nominal geringer gegenüber der Kontrolle.
- Die Pyruvatkinaseaktivität in der Leber, der Niere und im Muskel war bei den Lämmern der Kontrollgruppe nach der 8. Lebenswoche stets nominal oder signifikant höher, wenn diese der „cross-over“-Behandlung zugeteilt waren, also

Arsen aufnahmen, gegenüber den Lämmern der Kontrollgruppe, die kein arsenkontaminiertes Konzentrat erhielten. Die Aufnahme von arsenhaltigem Konzentrat führte jedoch nicht zwangsläufig zu höheren Pyruvatkinaseaktivitäten.

Tabelle 29: Pyruvatkinaseaktivität im Muskel von Lämmern der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (U/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3)

Zeitpunkt	Kontrolle	Arsen	P-Wert [#]
Geburt (als Zwilling)	4,1 0,33	2,5 1,22	0,089
Geburt (als Einzeltier)	3,4 0,67	3,0 1,06	0,632
Geburt (alle; n=6)	3,7 0,63	2,7 1,06	0,074
4 Wochen p.p.	4,9 ⁺	6,9 1,58	0,206

8 Wochen p.p.	5,2 0,32	4,0 1,09	0,421
8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung*)	6,5 ⁺	4,2 1,20	0,092

⁺ n=2, daher Berechnung einer Standardabweichung nicht möglich

* Lämmer der Kontrollgruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. arsenkontaminiertes Konzentrat, Lämmer der Arsengruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. nicht-arsenkontaminiertes Konzentrat

[#] P-Werte aus dem Vergleich der Enzymaktivitäten zwischen allen 8 Wochen alten Lämmern können Tab. A26 entnommen werden

9.3.2 Hexokinase/Glukokinase

In der Leber der Mutterschafe unterschieden sich die Aktivitäten der Glukokinase zwischen den Behandlungen nicht (Tab. 30, Tab. A31).

In der Kontrollgruppe wiesen die als Zwilling geborenen Lämmer eine tendenziell höhere Aktivität dieses Enzyms auf als die Einzeltiere der Kontrollgruppe und auch als die Lämmer der Arsengruppe. Nominal höher war auch die Glukokinaseaktivität der 8 Wochen alten Lämmer der Arsengruppe gegenüber denen der Kontrolle. In diesem Alter war die Glukokinaseaktivität in der Leber der Kontrolllämmer, die in der „cross-over“-Behandlung Arsen aufnahmen am geringsten und am höchsten in der Arsengruppe mit regulärer Behandlung (Tab. 31). Signifikante Unterschiede konnten aber nicht gesichert werden.

Tabelle 30: Glukokinaseaktivität in der Leber von Mutterschafen der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3)

Zeitpunkt	Kontrolle	Arsen	P-Wert
Versuchsbeginn	13,6 1,95		
Ablammung	6,0 4,72	7,2 2,00	0,712
8 Wochen p.p.	10,1 5,31	16,1 3,35	0,177

Tabelle 31: Glukokinaseaktivität in der Leber von Lämmern der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3)

Zeitpunkt	Kontrolle	Arsen	P-Wert [#]
Geburt (als Zwilling)	31,3 2,13	22,8 6,58	0,101
Geburt (als Einzeltier)	25,1 7,92	22,8 2,53	0,663
Geburt (alle; n=6)	28,2 6,20	22,8 4,46	0,115
4 Wochen p.p.	16,6 ⁺	14,1 8,70	0,732
8 Wochen p.p.	9,6 0,72	15,3 6,41	0,374
8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung*)	5,6 ⁺	12,0 3,74	0,365

⁺ n=2, daher Berechnung einer Standardabweichung nicht möglich

* Lämmer der Kontrollgruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. arsenkontaminiertes Konzentrat, Lämmer der Arsengruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. nicht-arsenkontaminiertes Konzentrat

[#] P-Werte aus dem Vergleich der Enzymaktivitäten zwischen allen 8 Wochen alten Lämmern können der Tab. A27 entnommen werden

Die Hexokinaseaktivität in der Niere der Mutterschafe war 8 Wochen nach der Ablammung in der Arsengruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Tab. 32, Tab. A32). Zum Zeitpunkt der Geburt war hier nur eine Tendenz vorhanden. In der Kontrollgruppe der Lämmer wiesen – wie schon in der Leber – die als Zwilling geborenen Lämmer tendenziell höhere Aktivitäten der Hexokinase auf gegenüber den Einzeltieren der Kontrollgruppe und allen Lämmern aus der Arsengruppe (Tab. 33). Die Lämmer der

Arsengruppe, die arsenhaltiges Konzentrat aufnahmen, wiesen signifikant geringere Enzymaktivitäten auf als die 8 Wochen alten Lämmer der Arsengruppe, die kein arsenhaltiges Konzentrat erhielten („cross-over“-Behandlung). Die Aufnahme von Arsen in der Kontrollgruppe führte dagegen zu einer signifikant höheren Hexokinaseaktivität in der Niere gegenüber den Lämmern der Arsengruppe, die ebenfalls Arsen aufnahmen.

Tabelle 32: Hexokinaseaktivität in der Niere von Mutterschafen der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3)

Zeitpunkt	Kontrolle	Arsen	P-Wert
Versuchsbeginn	13,1 0,55		
Ablammung	7,1 1,05	9,0 0,92	0,081
8 Wochen p.p.	11,2 ^a 0,31	13,6 ^b 0,98	0,015

^{a,b} unterschiedliche Hochbuchstaben in einer Zeile kennzeichnen signifikante Differenzen zwischen den Varianten laut t-Test ($P \leq 0,05$)

Tabelle 33: Hexokinaseaktivität in der Niere von Lämmern der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3)

Zeitpunkt	Kontrolle	Arsen	P-Wert
Geburt (als Zwilling)	12,7 1,28	9,1 2,17	0,072
Geburt (als Einzeltier)	8,9 2,0	9,6 0,61	0,598
Geburt (alle; n=6)	10,8 2,54	9,4 1,45	0,257
4 Wochen p.p.	10,2 ⁺	10,2 0,58	0,952
8 Wochen p.p.	10,8 ^{AB} 1,18	9,3 ^A 0,62	0,557
8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung*)	13,7 ^{B+}	13,2 ^B 1,90	0,980

^{A,B} unterschiedliche Kapitalchen kennzeichnen signifikante Differenzen laut Tukey-Kramer im Vergleich aller 8 Wochen alten Lämmer ($P \leq 0,05$; P-Werte können der Tab. A27 entnommen werden)

⁺ n=2, daher Berechnung einer Standardabweichung nicht möglich

* Lämmer der Kontrollgruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. arsenkontaminiertes Konzentrat, Lämmer der Arsengruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. nicht-arsenkontaminiertes Konzentrat

Die Messung der Hexokinaseaktivität im Muskel wurde als ungenau eingeschätzt. Einerseits war in einigen Fällen die Linearität des Anstiegs der Extinktion nicht 100%ig gegeben, andererseits war die Wiederholbarkeit der Messungen teilweise unzureichend. Folglich traten hohe Schwankungen zwischen den Wiederholungen auf. Diese wurden zum Teil aber auch auf tierindividuelle Unterschiede zurückgeführt (Tab. 34 und 35, A33). Auch die Mittelwerte variierten stark, sodass kaum Unterschiede gesichert werden konnten. Die Hexokinaseaktivität im Muskel der 4 Wochen alten Lämmern war jedoch in der Arsengruppe signifikant höher als in der Kontrolle. Die Aufnahme von arsenhaltigem Konzentrat führte in beiden Gruppen zu tendenziell höheren Hexokinaseaktivitäten gegenüber den Lämmern, die kein arsenkontaminiertes Konzentrat erhielten. Bei den Mutterschafen war zum Zeitpunkt der Ablammung die Hexokinaseaktivität in der Arsengruppe nominal höher als in der Kontrollgruppe. 8 Wochen nach der Ablammung war es umgekehrt.

Tabelle 34: Hexokinaseaktivität im Muskel von Mutterschafen der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3)

Zeitpunkt	Kontrolle	Arsen	P-Wert
Versuchsbeginn	43,1 11,09		
Ablammung	17,8 11,38	45,2 24,85	0,158
8 Wochen p.p.	53,6 18,88	39,1 18,17	0,393

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Arsenzulage im Futter bei den Mutterschafen fast immer zu einer etwas höheren Glukokinase- und Hexokinaseaktivität führte. Die als Zwillings geborenen Lämmer der Kontrollgruppe wiesen in 2 Fällen (Leber, Niere) tendenziell höhere Enzymaktivitäten auf als alle anderen Einzeltiere zu diesem Zeitpunkt. Grundsätzlich bewirkte die Aufnahme von arsenhaltigem Konzentrat durch die Lämmer weder eine eindeutige Steigerung, noch eine eindeutige Verminderung der Glukokinase- und Hexokinaseaktivität.

Tabelle 35: Hexokinaseaktivität im Muskel von Lämmern der Kontroll- und Arsengruppe zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Mittelwert und Standardabweichung; n=3)

Zeitpunkt	Kontrolle	Arsen	P-Wert [#]
Geburt (als Zwilling)	38,5 25,61	34,7 19,35	0,848
Geburt (als Einzeltier)	37,9 24,14	45,1 15,18	0,685
Geburt (alle; n=6)	38,2 22,26	39,9 16,55	0,883
4 Wochen p.p.	38,2 ^{a+}	91,4 ^b 16,53	0,030
8 Wochen p.p.	60,4 22,39	43,2 19,92	0,843
8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung*)	80,2 ⁺	37,5 23,23	0,336

^{a,b} unterschiedliche Hochbuchstaben in einer Zeile kennzeichnen signifikante Differenzen zwischen den Varianten laut t-Test ($P \leq 0,05$)

⁺ n=2, daher Berechnung einer Standardabweichung nicht möglich

* Lämmer der Kontrollgruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. arsenkontaminiertes Konzentrat, Lämmer der Arsengruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. nicht-arsenkontaminiertes Konzentrat

[#] P-Werte aus dem Vergleich der Enzymaktivitäten zwischen allen 8 Wochen alten Lämmern können Tab. A27 entnommen werden

9.4 Proteingehalt in der Frischmasse

Es wurden keine Unterschiede im Proteingehalt der Leber, der Niere und des Muskelgewebes zwischen der Kontroll- und Arsengruppe festgestellt (Tab. A34 bis A36).

10 *In vivo*-Studien: Diskussion

10.1 Verdaulichkeitsversuch

Die Zulage von Arsen führte im Verdaulichkeitsversuch zu einer signifikant höheren Verdaulichkeit der Rohfaser und auch im Versuch zur Pansensimulation (*in vitro*-Studien) bewirkte der Einsatz von 20 mg As/kg T als Na-Arsenat einen höheren Abbau der Rohfaser, obwohl der Unterschied hier nicht gesichert werden konnte. Allerdings wurde im Verdaulichkeitsversuch Arsentrioxid eingesetzt, welches im Versuch zur Pansensimulation eher zu einer tendenziell geringeren Abbaubarkeit der Rohfaser gegenüber der Kontrollgruppe führte. Ein Vergleich von Abbauraten zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Versuchen auf quantitativer Ebene ist zwar ohnehin nur begrenzt möglich, es wurde jedoch erwartet, dass sich die Wirkung von Arsen im *in vitro*-Versuch auch in der *in vivo*-Untersuchung widerspiegelt. In der Pansensimulation wird lediglich das Milieu des Pansens nachgestellt. Im Tier hat die Komplexität des gesamten Verdauungsapparates einen weiteren Einfluss auf die Verdaulichkeit der Rohnährstoffe.

Anhand der Gegenüberstellung der Aufnahme und Ausscheidung von Arsen war erkennbar, dass scheinbar eine ausgeglichene Bilanz vorliegt. Die um den Wert „0“ schwankenden Differenzen zwischen der Arsenaufnahme und -ausscheidung belegen hierbei aber nicht zwangsläufig eine höhere oder geringere Arsenausscheidung als -aufnahme oder umgekehrt. Diese Differenzen begründen sich eher in Messungenauigkeiten bei der Arsenanalyse.

Die nach ca. 12 bis 24 h nach Entzug des Arsens scheinbar wieder ansteigende Arsenkonzentration im Kot resultiert vermutlich aus dem im Konzentratfutter enthaltenen Arsen des Vortages, welches nicht im Pansen oder Verdauungstrakt absorbiert wurde. Daher kam es zu diesem Zeitpunkt zu einer Anflutung von Arsen im Kot. Die mit der Zeit kontinuierlich sinkende Arsenkonzentration im Kot beruht wahrscheinlich zum größten Teil auf einem Verdünnungseffekt von Arsen im Pansen, hervorgerufen durch die weitere Aufnahme von Futter und Wasser. Nach fast 5 Tagen nach der letzten Aufnahme von Arsen konnten noch Konzentrationen von über 1 mg As/kg T im Kot nachgewiesen werden. Diese 5-tägige Verweildauer von Arsen im Verdauungstrakt der Tiere begünstigte möglicherweise eine weitere Absorption von Arsen.

Die Ausscheidung von Arsen über die Niere bewies auch hier eine Aufnahme in den Blutkreislauf. Dadurch besteht die Gefahr einer Akkumulation von Arsen in den Geweben. Die Höhe der Anreicherung und zusätzlich eine mögliche Abhängigkeit der Dauer der Exposition wurden im Versuch mit Mutterschafen überprüft und wird auch in diesem Zusammenhang diskutiert.

Die Mechanismen der Aufnahme von Arsen im Gastrointestinaltrakt wurden bisher kaum erforscht. Wie bereits erwähnt, kann Arsenat über Phosphattransporter in Zellen gelangen (KENNEY & KAPLAN, 1988; CHEN *et al.*, 1990; HUANG & LEE, 1996). SCHRÖDER *et al.* (1995) bewiesen eine aktive Phosphataufnahme im Dünndarm bei Kleinwiederkäuern. In Versuchen am Rattendarm (*in vivo* und *in vitro*) wurde festgestellt, dass die Absorption von Arsenat ebenso hauptsächlich im Dünndarm stattfindet und Carrier-vermittelt erfolgt (GONZÁLEZ *et al.*, 1995; GONZÁLEZ *et al.*, 1997). Aufgrund des reduzierenden Milieus wird jedoch nur ein geringer Anteil an Arsenat unter Begünstigung eines hohen Arsenit-Anteiles im Verdauungstrakt vorhanden sein. Das Vorkommen eines Arsenit-transportierenden Aquaglyceroporins (AQP 9) im Gastrointestinaltrakt wurde zwar für den Menschen und an der Maus nachgewiesen (OKADA *et al.*, 2003), Untersuchungen speziell an Wiederkäuern wurden diesbezüglich bisher aber nicht durchgeführt. Laut HUANG & LEE (1996) kann Arsenit auch durch Diffusion in Zellen gelangen. VAHTER & NORIN (1980) wiesen bei Mäusen nach Verabreichung einer Arsenlösung mittels einer Magensonde (in Übereinstimmung mit anderen Forschungsergebnissen) eine annähernd 100 %ige Absorption von Arsenit und Arsenat nach. TAM *et al.* (1979) ermittelten nach oraler Aufnahme einer Arsensäurelösung beim Menschen eine Absorptionsrate von ca. 60 %. Nach MCKINNEY (1992) liegt Arsen in wässriger Lösung entweder gelöst oder Partikel-assoziiert vor, wobei die Absorption hauptsächlich von der Löslichkeit der Verbindung abhängt. Diese kann durch die Zusammensetzung der Nahrung infolge physikalischer und chemischer Interaktionen z.B. mit anderen Spurenelementen, Proteinen, Fetten, maßgeblich beeinflusst werden. In den Untersuchungen von VAHTER & NORIN (1980) und TAM *et al.* (1979) kam es sicher nicht zu Interaktionen mit der Nahrungsmatrix und das Arsen lag in gelöster Form vor. In der eigenen Untersuchung wird jedoch vermutlich ein Einfluss des gleichzeitig aufgenommenen Futters auf die Absorption des Arsens vorhanden gewesen sein.

In einem Versuch mit 6 bis 7 Monaten alten Lämmern wurden nach einmaliger Arsengabe (als Arsenrichlorid) über eine Magensonde jeweils 78 und 21 % der gesamten

verabreichten Dosis über den Kot bzw. Harn innerhalb weniger Tage wieder ausgeschieden (BERESFORD *et al.*, 2001). HANSEN *et al.* (2003) untersuchten die Arsenausscheidung bei Schafen (North Ronaldsay Schafe), deren natürliche Futterquelle Braunalgen darstellten. Entsprechend des Gehaltes an Arsen nahmen Schafe über 6 Tage ca. 35 mg As/d (mit oder ohne vorherige Adaptation an das Futter) in organischer Form auf. Hier wurde mit geschätzten 86 % ein Großteil des Arsens über den Harn ausgeschieden. Dieses Ergebnis deckt sich mit Erkenntnissen von FRANCESCONI *et al.* (2002a), wonach infolge einer Aufnahme von synthetischem Arsenozucker, der hauptsächlichlichen Arsenspezies in marinen Algen, beim Menschen die Arsenausscheidung zu 80 % über den Harn erfolgte. Im Gegensatz dazu wurde in einer Studie mit Mäusen nur 13 % des Arsens nach oraler Gabe von Arsenozuckern über den Harn ausgeschieden (SHIOMI *et al.*, 1990). Im vorliegenden Versuch mit der Erdezulage schwankte der über den Harn ausgeschiedene Anteil an Arsen in der Kontrollgruppe in Abhängigkeit vom Futtermittel stark (14 % beim Grünfutter bis 35 % beim Heu). Der relative Gehalt an ausgeschiedenem Arsen im Harn in der Gruppe mit der Erde war lediglich um wenige Prozentpunkte höher als in der Kontrollgruppe. Es ist jedoch zu beachten, dass es sich bei dem eingesetzten Arsentrioxid um eine anorganische Arsenverbindung handelte. Vermutlich hängt die Höhe des ausgeschiedenen Arsenanteiles über den Harn auch von der Art der aufgenommenen Arsenspezies ab (organisch vs. anorganisch).

10.2 Verbleib von Arsen in Mutterschafen und Lämmern

Blutbild und Serum

Die Untersuchung der Blutwerte (Erythrocyten, Leukocyten, Hämoglobin, Hämatokrit) zeigte, dass durch die Arsenaufnahme der Gehalt an Leukocyten im Blut höher war als in der Kontrollgruppe. Die anderen Blutparameter wurden nicht beeinflusst. ROMEO *et al.* (1997) untersuchten einen Fall akuter Arsenintoxikation, wobei infolge einer Arsinvergiftung eine starke Hämolyse der roten Blutkörperchen eintrat. In einer weiteren Studie zur Behandlung von Leukämie mit Arsentrioxid (10 mg As/d) über einen längerfristigen Zeitraum von maximal 54 Tagen traten keine Abnahmen in der Anzahl der Erythrocyten auf. Dies war jedoch bei solchen Patienten der Fall, die therapiebegleitend zusätzlich ein Chemotherapeutikum in geringer Dosis erhielten (SHEN *et al.*, 1997). Auch in einem Fallbeispiel zur langjährigen Arseneinnahme im Rahmen der traditionellen chinesischen Medizin wurde eine hämolytische Anämie diagnostiziert (LEE *et al.*, 2004).

RANA *et al.* (2008) stellten – in Kontrast zu den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit – zusätzlich einen Abfall der Leukocyten durch eine chronische Arsenaufnahme bei Rindern fest. In einer Untersuchung von BUCY *et al.* (1954) an Lämmern über 2 Monate konnten durch den Einsatz verschiedener Arsenverbindungen (organische und anorganische) in geringfügig höherer Dosis als in der eigenen Arbeit keine Unterschiede im Hämoglobin-, Erythrocyten- und Leukocytengehalt, sowie im Hämatokrit festgestellt werden. Bei einer weiteren drastischen Erhöhung der Dosis konnten ein verminderter Erythrocyten- und Hämoglobingehalt, hervorgerufen durch pathologische Veränderungen in der Leber und Niere der Tiere, ermittelt werden. Zu vereinzelt Hinweisen bezüglich einer verstärkten Bildung roter Blutkörperchen durch Arsen – möglicherweise als Ursache der leistungssteigernden Eigenschaften bei Arsenik-Essern im 16. und 17. Jahrhundert in der Steiermark (CULLEN, 2008) – liegen keine wissenschaftlichen Belege vor.

SHEN *et al.* (1997) bekräftigten eine Bindung des Arsens im Blut von 95 bis 97 % an das Hämoglobin. Den eigenen Analyseergebnissen zufolge hatte dies jedoch keine Auswirkungen auf den Gehalt an Erythrocyten im Blut oder auf den Hämoglobingehalt der roten Blutkörperchen. Der signifikante Abfall im Hämatokrit in beiden Gruppen resultierte aus dem Rückgang der zellulären Bestandteile des Blutes vom zweiten auf den dritten Versuchsmonat, verursacht durch die Kumulation des Abfalls der Erythrocyten und Leukocyten. Generell hatte die Zeit einen signifikanten Einfluss auf den Erythrocyten- und Hämoglobingehalt, sowie auf das Hämatokrit. Die Unterschiede im Erythrocytengehalt in der Arsengruppe über die Versuchsdauer waren in der Tendenz ebenso vorhanden, wie in der Kontrollgruppe. Sie waren jedoch etwas geringer und konnten daher nicht gesichert werden. Bei ŽVORC *et al.* (2006) wurde neben einer Abnahme des Leukocytengehaltes auch ein Abfall des Erythrocytengehaltes und des Hämoglobins bei Sauen im Verlauf der Trächtigkeit festgestellt. Da diese Effekte im vorliegenden Versuch auch in beiden Gruppen existent waren, stehen sie höchstwahrscheinlich ebenso mit der Trächtigkeit der Tiere im Zusammenhang.

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass zwar viele Untersuchungen zur Toxizität, Entgiftung, Akkumulation, Ausscheidung und physiologischen Veränderungen durch Arsen an Ratten durchgeführt wurden, deren Erythrocyten jedoch im Gegensatz zu anderen tierischen Organismen eine äußerst hohe Affinität zu Arsen besitzen und somit Ratten als Versuchstiere für ungeeignet befunden wurden (NAS, 1977).

Der Arsengehalt im Serum lag zu Versuchsbeginn bei ca. 5 µg As/l. Im Laufe des Versuches kam es zu geringfügigen Schwankungen innerhalb der Kontrollgruppe. Diese

könnten auf die Variation in der Versuchstierzahl zurückzuführen sein, gekennzeichnet durch Abgänge aufgrund von Schlachtungen. Die Konzentration an Arsen im Serum lag in der Arsengruppe teilweise um das 6 bis 8fache höher gegenüber der Kontrollgruppe und schwankte im Versuchszeitraum von 27 bis 60 µg As/l. Diese Differenz kann teilweise durch den variierenden absoluten Gehalt an Arsen im Futter erklärt werden, welcher in Abhängigkeit der Höhe der Ration entsprechend dem Stadium der Trächtigkeit kalkuliert wurde (siehe auch Kapitel 8.3.2). Ab der 10. Versuchswoche erhöhte sich die absolute Arsenaufnahme mit Beginn der Phase der Hochträchtigkeit von 24,5 mg As/d auf 35,5 mg As/d. Während der Laktation (teils vor, teils nach der 12. Woche nach Versuchsbeginn, und damit dem 4. Beprobungszeitpunkt) betrug die tägliche Arsenaufnahme 45,5 mg, was sich im hohen Serum-Arsengehalt in der 16. Woche widerspiegelt. Jedoch konnte der starke Abfall des Gehaltes zum Messzeitpunkt der 20. Versuchswoche nicht geklärt werden, da die aufgenommene Arsenmenge nicht veränderte wurde.

In verschiedenen Untersuchungen anderer Autoren wurde versuchsbegleitend der Arsengehalt in den Erythrocyten erfasst. Eine Beurteilung des Arsenstatus auf diesem Wege ist aufgrund der kurzen Halbwertszeiten des Arsens im Blut jedoch nicht praktikabel (Umweltbundesamt, 2003) und wurde daher im vorliegenden Versuch anhand des Serums vorgenommen. Dieser Überlegung lag zugrunde, dass eine Elimination von Arsen aus dem Serum möglicherweise weniger schnell erfolgt und dadurch einen Vergleich der Arsenkonzentrationen im Serum zu den Beprobungszeitpunkten besser ermöglicht.

Die Unterschiede in den Arsenkonzentrationen des Serums der Lämmer beider Versuchsgruppen zum Zeitpunkt der Geburt lassen Rückschlüsse auf eine transplazentare Übertragung von Arsen auf den Fötus zu. Eine transplazentare Übertragung von Arsen wurde bereits durch FERM (1977) am Beispiel des Hamsters bestätigt. In einer weiteren Untersuchung mit Mäusen wurde durch die Vorbelastung der Muttertiere durch Arsen eine erhöhte Krebsinzidenz bei den Nachkommen festgestellt (WAALKES *et al.*, 2003). Die Lämmer waren bei der Probennahme allerdings schon 2 bis 3 Tage alt, sodass auch die Aufnahme von Kolostral- und Muttermilch zu einer höheren Arsenkonzentration im Serum beigetragen haben könnte. Der Arsengehalt der Milch führte aber während der Laktationsphase zu keiner weiteren messbaren Erhöhung der Arsenkonzentration im Serum der Lämmer. Erst die Zufütterung von arsenhaltigem Konzentrat von der 5. bis zur 8. Lebenswoche bewirkte einen drastischen Anstieg der Arsenkonzentration im Serum. Diese war vergleichbar mit der Höhe der Arsenkonzentration im Serum der Mutterschafe

aus der Arsengruppe. Zwar verlief die Anreicherung relativ schnell, aber auch eine Abreicherung von Arsen aus dem Serum innerhalb dieser 4 Wochen konnte bei den Lämmern der Arsengruppe festgestellt werden, die in der „cross-over“-Behandlung nicht-arsenkontaminiertes Konzentratfutter erhielten.

Wolle und Horn

Arsen akkumulierte bei den Mutterschafen in der Wolle stärker als im Horn. Unter allen untersuchten Geweben wiesen diese beiden die höchsten Arsenkonzentrationen auf. Auch HINDMARSH (2000) berichtete von Haaren, Nägeln und Haut als Gewebe mit den höchsten Arsengehalten. Grund dafür sind hohe Cystein- und damit Thiolgruppengehalte des Baustoffes Keratin als Angriffspunkt des Arsenits. In der Schafwolle wurde ein Cysteingehalt von 8,0 bis 10,9 % analysiert (WILSON & LEWIS, 1927), in Lämmerwolle sogar ein Anteil von 13,1 % (BLOCK *et al.*, 1939). Darüber hinaus konnten Gene im Haarfollikel identifiziert werden, die „ultra-high-sulphur“-Keratinproteine in der Schafwolle codieren, deren Cysteinanteil mit 30 % prognostiziert wurde (MACKINNON *et al.*, 1990). Im Normalfall dient die Ausbildung der Disulfidbrücken im Keratin der Vernetzung zur Erlangung von Härte und Widerstandsfähigkeit (LÜLLMANN-RAUCH, 2006). Eine Beeinträchtigung dieser Eigenschaften durch die Einlagerung von Arsen wurde nicht überprüft.

In verschiedenen Studien wurde die Einlagerung von Arsen in Wolle bei Braunalgen-verzehrenden North Ronaldsay Schafen untersucht. FELDMANN *et al.* (2000) stellten bei einer täglichen Arsenaufnahme von 45 bis 90 mg in organischer Form einen mittleren Arsengehalt in der Wolle von 10,5 (\pm 5,7) mg As/kg fest. Eine Aufreinigung der Wolle fand vor dem Aufschluss jedoch nicht statt, sodass ein geringer Anteil des Arsens vermutlich auch mit dem Wollfett entfernt wurde. Hierzu führten RAAB *et al.* (2002) Untersuchungen an North Ronaldsay Schafen durch, die aus Braunalgen im Mittel 36 mg Arsen pro Tag aufnahmen. Dabei wurden 3 bis 13 mg As/kg in der Wollfaser ermittelt und maximal 3,9 mg As/kg im Lanolin, welches einen Anteil von 20 % am Gewicht der Wolle besaß. Die Akkumulation von Arsen im Haarkleid von Rindern, die arsenbelastetes Trinkwasser von bis zu 3,7 mg As/l zu sich nahmen, war dagegen mit durchschnittlich 0,7 mg As/kg nicht besonders hoch, jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe (0,3 mg/kg) signifikant erhöht (NANDI *et al.*, 2005).

Im eigenen Versuch lag die Arsenkonzentration in der Wolle nach einer 20-wöchigen Arsenapplikation mit 4,1 mg As/kg T im ähnlichen Bereich wie in den Untersuchungen der genannten Autoren. Allerdings wurde in der eigenen Untersuchung anorganisches Arsen eingesetzt, in den Versuchen der genannten Autoren verzehrten die Tiere organische Arsenverbindungen. Das Lanolin wurde wahrscheinlich durch den Waschvorgang größtenteils entfernt und damit womöglich auch ein geringer Anteil an Arsen. In Anbetracht der täglichen Arsenaufnahme von 45,5 mg pro Tier und Tag (im letzten Versuchsabschnitt) war die Einlagerung in der Wolle jedoch nicht außerordentlich groß. Möglicherweise wurde durch die begrenzte Anzahl an Cysteinresten bereits ein Plateau in der Einlagerung erreicht.

Im Horn von Rindern wurde ein geringerer Cysteinanteil festgestellt als im menschlichen Fingernagel (8,2 bzw. 12,0 %; BLOCK *et al.*, 1939). Angaben zum Cysteingehalt im Klauenhorn von Schafen liegen nicht vor, weshalb in diesem Gewebe keine Rückschlüsse auf die potentiell einlagerbare Arsenmenge gezogen werden können. In der Arsengruppe stieg die Arsenkonzentration im Horn im Laufe des Versuches nur geringfügig an. Dagegen wiesen die Lämmer dieser Gruppe schon zum ersten Beprobungszeitpunkt mit einem Alter von 3 bis 19 Tagen relativ hohe Konzentrationen im Horn auf. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass zur Beprobung des Klauenhorns nur der nachgewachsene Teil (Tragrand) verwendet wurde. Da das Klauenhorn des Schafes ca. 4 mm in 4 Wochen wächst (RIEGER *et al.*, 1984), scheint eine steigende Arsenkonzentration in Richtung des Klauenursprungs wahrscheinlich.

In der Wolle der Lämmer war die Arsenkonzentration etwas geringer als im Horn. In der Kontrollvariante konnte in beiden Geweben kein Arsen nachgewiesen werden. Daraus ist zu schließen, dass das nachgewiesene Arsen in der Wolle und im Horn der Lämmer der Arsengruppe einerseits vermutlich aus der Milch stammte, andererseits bereits transplazentar übertragen wurde. Bei den Lämmern der Arsengruppe mit der „cross-over“-Behandlung konnte vor allem in der Wolle eine Abnahme der Arsenkonzentration durch den Verzehr von nicht-arsenkontaminiertem Konzentratfutter beobachtet werden. Der erneute Anstieg der Arsenkonzentration in der Wollprobe eines Lamms bei einer weiteren Probennahme kann möglicherweise durch einen hohen Messfehler oder Ungenauigkeiten in der Probennahme erklärt werden.

Die Höhe der Konzentration von Arsen in der Wolle bei Lämmern der Kontrollgruppe nach der Umstellung auf arsenhaltiges Konzentrat war zur nachfolgenden Probennahme ähnlich hoch, wie die Arsenkonzentration in der Arsengruppe. Zwei Lämmer nahmen bis zu diesem Zeitpunkt jeweils 181 und 201 mg Arsen über das Konzentrat auf. Die mangelnde Konzentrataufnahme des dritten Lamms (ca. 9 mg Arsen) spiegelte sich in einer nicht messbaren Arsenkonzentration in der Wolle wider.

Im Horn war in den „cross-over“-Behandlungen beider Gruppen weder der Abfall der Arsenkonzentration nach der Aufnahme von nicht-arsenkontaminiertem Konzentrat, noch die Anreicherung von Arsen bei der Aufnahme von arsenhaltigem Konzentrat so stark ausgeprägt wie in der Wolle. Die Arsenkonzentration im Horn resultierte im beprobten Tragrand teilweise noch aus der Zeit, in der die Lämmer noch kein Konzentratfutter erhielten. Somit führte die Aufnahme von arsenkontaminiertem bzw. nicht-arsenkontaminiertem Konzentrat noch nicht zu einer An- bzw. Abreicherung von Arsen im beprobten Tragrand, sondern ein Konzentrationsgefälle wäre eher in Richtung des Klauenursprungs zu vermuten.

Muskel, Leber, Niere

Zum Zeitpunkt der Ablammung wurden bereits erhöhte Arsenkonzentrationen im Muskel, in der Leber und der Niere der Mutterschafe ermittelt. Bis zu diesem Zeitpunkt erhielten diese bereits 2 bis 3 Monate lang arsenkontaminiertes Konzentratfutter. Die Zufuhr von Arsen über weitere 8 Wochen führte lediglich zu einer leichten Steigerung der Arseneinlagerung. Die höchste Arsenkonzentration innerhalb dieser 3 beprobten Gewebe wies die Niere auf. Dies resultiert möglicherweise aus der Aufgabe der Harnproduktion. Da Arsen in großen Mengen renal ausgeschieden und durch die Filtration des Blutes in den Nierenkörperchen mit dem Primärharn abgeführt wird, könnte dieser zu einer Erhöhung der Arsenkonzentration in der Niere beigetragen haben.

Arsen induziert – vor allem als Arsenit – die Bildung von Metallothioninen in verschiedenen Organen (KREPPPEL *et al.*, 1993). Diese dienen primär der Bindung und Bereitstellung von Kupfer- und Zinkionen (TOYAMA *et al.*, 2002), sekundär aber auch der Bindung und somit Entgiftung von Schwermetallen (HAMER, 1986). Am Beispiel menschlicher Hepatocyten wurde durch TOYAMA *et al.* (2002) *in vitro* auch eine Bindung von Arsen nachgewiesen. Die Induktion der Metallothionin-Synthese durch Arsen (in Mäusen) war in der Leber um ein Vielfaches stärker ausgeprägt als in der Niere (KREPPPEL *et al.*, 1993). HAMER (1986) berichtet von einer gewebespezifischen Bindungsaffinität des

Metallothionins: in der Leber wird fast ausschließlich Zink und in der Niere beachtliche Mengen an Kupfer und Cadmium gebunden. Möglicherweise erklärt eine dem ebenfalls toxischen Cadmium analoge Bindung des Arsens in der Niere die höheren Konzentrationen gegenüber der Leber, obwohl laut KREPPEL *et al.* (1993) die Metallothionin-Synthese durch Arsen in der Leber gegenüber der Niere deutlich höher war.

ALONSO *et al.* (2000) berichteten dagegen von der Leber als Hauptspeicherorgan für Kupfer im Wiederkäuer. In einer weiteren Untersuchung (ALONSO *et al.*, 2002) stellten sie bei Rindern einer geringfügig schwermetallbelasteten Region Spaniens zusätzlich eine positive Korrelation zwischen dem Arsen- und Kupfergehalt fest, die sie folgendermaßen begründeten: Eine erhöhte Kupferaufnahme verursacht im Pansen von Wiederkäuern die Bildung unlöslicher Kupferselenide und damit eine verminderte Selen-Aufnahme. Dies führt zur Reduzierung des Selen-abhängigen Enzyms GSH-Peroxidase, welches eine essentielle Rolle bei der Entgiftung und Ausscheidung von Arsen einnimmt. Als Resultat kommt es zu Störungen in der Arsenexkretion und folglich zu Arseneinlagerungen. Kupfergehalte in den Organen oder Futtermitteln wurden in der vorliegenden Arbeit nicht ermittelt, sollten möglicherweise jedoch bei der Beurteilung arsenbelasteter Böden bzw. Futtermittel ebenfalls Beachtung finden.

In der bereits erwähnten Untersuchung mit North Ronaldsay Schafen mit einer täglichen Arsenaufnahme von circa 45 bis 90 mg (in organischer Form) über Braunalgen wurden Arsenkonzentrationen von 0,3, 0,6 und 0,7 mg As/kg Leber, Niere und Muskel nachgewiesen (FELDMANN *et al.*, 2000). Bei Verrechnung der Trockenmasse (aus eigenem Versuch; Leber ca. 30 %, Niere ca. 20 %, Muskel ca. 25 %) sind die Arsenkonzentrationen in deren Untersuchung etwas höher (1,0 mg, 3 mg und 2,8 mg As/kg T für Leber, Niere und Muskel) im Vergleich zur vorliegenden Arbeit. Der abweichende Metabolismus der aufgenommenen Arsenspezies oder genetische Unterschiede zwischen verschiedenen Rassen könnten hierbei eine Rolle spielen.

In den Geweben der Lämmer wurden erst im Alter von 8 Wochen hohe Arsenkonzentrationen ermittelt, sowohl in der Arsengruppe, als auch bei den Lämmern der Kontrollgruppe, die in der „cross-over“-Behandlung ab der 5. Woche arsenhaltiges Konzentratfutter erhielten. Trotz unterschiedlich hoher Konzentrat- und damit Arsenaufnahme durch die Lämmer (n=5) von 180 bis 340 mg Arsen innerhalb von 4 Wochen waren die Arsenkonzentrationen im Muskel, in der Leber und der Niere zwischen den Tieren relativ ähnlich. An mindestens 12 aufeinanderfolgenden Tagen vor der Schlachtung wurde dieselbe Arsenmenge (14,5 mg Arsen pro Tier und Tag) von den

Lämmern aufgenommen, sodass diese kontinuierliche Aufnahme von Arsen über diesen Zeitraum wahrscheinlich der Grund dieser ähnlichen Arsenkonzentrationen ist. Tierindividuelle Unterschiede bedingten vermutlich die unterschiedlich starke Akkumulation von Arsen im Muskel. Ein Zusammenhang zwischen der absolut aufgenommenen Arsenmenge und der Arsenkonzentration in diesen Geweben bestand nicht. Das Arsen in der Milch trug im Gegensatz zur Zufütterung von arsenhaltigem Konzentratfutter zu keiner messbaren Anreicherung bei.

Im Vergleich zu den Mutterschafen war die Konzentration an Arsen im Muskel, in der Leber und der Niere der Lämmer ähnlich. Die Größe der Organe der adulten Tiere ist aber wesentlich beträchtlicher, was eine höhere absolute Speicherkapazität an Arsen in den Organen der Muttertiere bedingt.

BERESFORD *et al.* (2001) erstellten anhand der Wiederfindungsrate von einmalig appliziertem radioaktiv markiertem Arsen bei Schafen ein Modell zur Berechnung der zu erwartenden Arsenkonzentration im Gewebe anhand der aufgenommenen Arsenmenge. Sie definierten das Verhältnis der Arsenkonzentration im Gewebe zur täglichen Arsenaufnahme als Koeffizienten für den Transfer. Im Muskel war dieser mit $2,5 \cdot 10^{-3}$ d/kg am geringsten, gefolgt von der Leber mit $9,1 \cdot 10^{-3}$ d/kg und der Niere mit $11 \cdot 10^{-3}$ d/kg. Daraus ist zu schließen, dass im Muskel die Arsenanreicherung am niedrigsten und in der Niere am höchsten war. Bei der Erstellung eines solchen Modells zur Akkumulation von Arsen in den Organen spielt sicher auch die Dauer der Arsenzufuhr eine Rolle, da erst nach dem Erreichen eines Plateaus in der Anreicherung von einem eingestellten Gleichgewicht zwischen Arsenaufnahme und -abgabe in den Geweben ausgegangen werden kann. Ob die einmalige Applikation bei BERESFORD *et al.* (2001) repräsentativ für eine längerfristige Aufnahme war, scheint fraglich. Möglicherweise wäre es auch angebracht gewesen, mit weiteren Dosierungen in unterschiedlicher Höhe als auch Dauer die ermittelten Koeffizienten zu validieren.

In Übereinstimmung mit BERESFORD *et al.* (2001) war aber auch im eigenen Versuch die Arsenanreicherung im Muskel am geringsten und in der Niere am höchsten, ebenso bei den Lämmern. Bei diesen war das Verhältnis der Arsenkonzentration im Gewebe zur aufgenommenen Arsenmenge jedoch deutlich höher als bei den Mutterschafen. Es wurde demzufolge ein höherer Anteil des aufgenommenen Arsens im Muskel, in der Leber und der Niere der Lämmer akkumuliert als bei den Mutterschafen. Dabei war die Arsenaufnahme, bezogen auf die Lebendmasse (LM), bei den Muttertieren (0,7 mg As/kg LM) ähnlich hoch wie bei den 8 Wochen alten Lämmern (0,6 mg As/kg LM). Zu Beginn

der Konzentrataufnahme der Lämmer mit einem Lebensalter von 4 Wochen lag die aufgenommene Arsenmenge jedoch mit 1,1 mg As/kg LM etwas höher.

Zur Überprüfung leistungssteigernder Eigenschaften von Arsen bei Wiederkäuern führten BUCY *et al.* (1954 und 1955) Langzeit-Versuche mit unterschiedlichen Arsenverbindungen (3-nitro-4-hydroxyphenylarsonsäure = Roxarson, Kaliumarsenit und Arsanilsäure) in verschiedenen Zulagestufen (0,002 bis 0,024 % Roxarson an der Gesamtration bzw. andere Arsenverbindungen in arsenäquivalenten Konzentrationen) an Lämmern und Mutterschafen durch.

Bei der Zulage vergleichbar geringer Konzentrationen an Arsenverbindungen (0,002 bis 0,006 %) in der ersten Untersuchung von BUCY *et al.* (1954) lag die maximale Arsenaufnahme pro Tier und Tag bei 27 mg (Tab. 36). Die Höhe der Anreicherung in den Geweben war jedoch weitestgehend unabhängig von der Höhe der aufgenommenen Arsenmenge. Möglicherweise waren hier die Unterschiede zwischen den Arsenkonzentrationen zu gering. Der reine Arsengehalt betrug in der eigenen Untersuchung 0,001 % in der Ration der Mutterschafe, bei abgesetzten Lämmern ca. 0,003 bis 0,004 % an der Gesamtration, wenn auch die Zusammensetzung der Grundration verschiedenartig war. Der Arsenanteil im Roxarson beträgt 28,5 %, sodass in den Versuchen von BUCY *et al.* (1954) die Supplementierung von 0,004 % bzw. 0,012 % Roxarson (und den Arsenäquivalenten Mengen an Kaliumarsenit und Arsanilsäure) der im eigenen Versuch eingesetzten Zulage an Arsen (jeweils für Mutterschafe bzw. Lämmer) gleichwertig war. Die Höhe der Anreicherung der anorganischen Arsenspezies Kaliumarsenit im Versuch von BUCY *et al.* (1954) bzw. Arsen trioxid in der eigenen Untersuchung war bei vergleichbar hoher Zufuhr in der Leber und Niere ähnlich. Auch hier wies die Niere die höchste Arsenkonzentration auf. Paradoxe Weise lag jedoch die Arsenkonzentration in den Organen bei den Tieren ohne Arsenzulage in einem ähnlichen Bereich wie die eigenen analysierten Werte in der Arsengruppe. Die um 1954 existierenden Messmethoden waren sicherlich noch nicht so präzise, verglichen mit den heutigen, vor allem im Bereich geringer Arsenkonzentrationen. Leistungssteigernde Eigenschaften im Sinne von positiven Effekten auf die Gewichtszunahme und Wollproduktion, als eigentlich primärer Untersuchungsansatz von BUCY *et al.* (1954), konnten nicht verzeichnet werden.

Tabelle 36: Mittlere tägliche Arsenaufnahme von Lämmern bei unterschiedlicher Höhe und Art der Arsenzulage, sowie Konzentrationen in Leber, Niere und Muskel bei BUCY *et al.* (1954) im Vergleich zur eigenen Untersuchung mit Lämmern (n=3 je Variante)

	mittlere As-Aufnahme (mg As/d)	Mittlere As-Konzentration (mg As/kg T ⁺)		
		Leber	Niere	Muskel
<i>ohne Arsenzulage</i>				
	<i>keine Angabe</i>	0,5	0,7	0,4
<i>0,002 %*</i>				
K-Arsenit	9,3	0,5	1,2	1,9
Arsanilsäure	8,2	3,1	3,7	0,9
Roxarson	7,7	1,5	3,8	3,8
<i>0,004 %*</i>				
K-Arsenit	17,1	0,6	1,3	1,0
Arsanilsäure	15,0	3,8	2,6	1,8
Roxarson	15,2	1,2	3,0	1,2
<i>0,006 %*</i>				
K-Arsenit	24,0	3,3	2,3	1,0
Arsanilsäure	23,3	-	3,7	1,8
Roxarson	26,9	1,4	3,0	1,2
eigene Ergebnisse [#]	13,0	0,6	1,1	0,4

⁺ mg As/kg T errechnet aus Frischmasse anhand eigener Werte der Trockenmassebestimmung

^{*} bezogen auf die Menge an Roxarson

[#] n=5

Durch den Einsatz von Arsenverbindungen mit einem hohen Anteil von 0,05 bis 0,4 % in der Ration wurden in einem weiteren Versuch mit Lämmern und Mutterschafen von BUCY *et al.* (1955) ebenfalls unabhängig von der Höhe der Zulage und Art der Verbindung in der Leber und Niere beachtliche Arsengehalte bis 10 mg As/kg T erzielt (Tab. 37). Diese gingen mit pathologischen Veränderungen einher. Im Muskel war die Akkumulation am geringsten mit Maximalwerten bis 4 mg As/kg T. Die Arsenanreicherung bei den Mutterschafen und Lämmern war auf ähnlichem Niveau. Die tägliche Arsenaufnahme war bei den Mutterschafen jedoch deutlich höher.

Tabelle 37: Mittlere tägliche Arsenaufnahme von Lämmern und Mutterschafen bei unterschiedlicher Höhe und Art der Arsenzulage, sowie Konzentrationen in Leber, Niere und Muskel bei BUCY *et al.* (1955) im Vergleich zur eigenen Untersuchung (n=3 je Variante)

	mittlere As-Aufnahme (mg/d)	Mittlere As-Konzentration (mg/kg T)		
		Leber	Niere	Muskel
<i>Lämmer</i>				
K-Arsenit	141	10,0	9,2	2,4
Arsanilsäure	216	10,6	9,1	1,4
Roxarson	421	10,7	9,0	0,9
eigene Ergebnisse ⁺	13	0,6	1,1	0,4
<i>Mutterschafe</i>				
K-Arsenit*	75	9,4	10,5	2,2
Arsanilsäure	287	12,7	7,1	1,6
Roxarson	880	6,5	6,7	1,5
eigene Ergebnisse (hochtragend)	36	0,4	0,8	0,3
eigene Ergebnisse (laktierend)	45	0,5	1,0	0,4

⁺ n=5, * n=2

Das Roxarson wurde bei den Mutterschafen geringfügiger akkumuliert. Arsanilsäure und Roxarson gehören der Gruppe Arsenspezies an, die vom Organismus nahezu komplett unverändert wieder ausgeschieden werden, wie von OVERBY & FREDRICKSON (1963) und MORRISON (1969) bei einer Untersuchung am Geflügel nachgewiesen wurde. Sie unterliegen in ihrer Einstufung als weitestgehend untoxische Arsenverbindungen keinem Metabolismus und akkumulieren daher als Verbindung an sich und nicht in der toxischen Form als Arsenat oder Arsenit. Dennoch riefen sie bei BUCY *et al.* (1955) in derart hoch dosierter Form Vergiftungserscheinungen bis hin zum Tod hervor. Möglicherweise kam es im Pansen durch die Mikroben zu Abbaureaktionen und damit zur Freisetzung des hoch toxischen Arsenits (neben DMA), wie es beim Abbau von roxarsonhaltigen

Geflügelexkrementen unter anaeroben Umweltbedingungen nachgewiesen wurde (GARBARINO *et al.*, 2001). Als eine ursächliche Spezies wurden hierbei Clostridien identifiziert (STOLZ *et al.*, 2007), deren Vorkommen auch im Pansen erwiesen ist (LESCHINE, 2005). Auch aus Arsanilsäure wurde unter anaeroben Bedingungen rasch Arsen freigesetzt (WOOLSON, 1975). Dies würde die stark toxische Wirkung analog zu anorganischen Arsenverbindungen erklären.

Die Anreicherung in den Geweben der Schafe bei BUCY *et al.* (1955) war enorm hoch. In Übereinstimmung mit verschiedenen anderen Versuchen war die Akkumulation von Arsen im Muskel am geringsten. Anhand dieses Versuches wird weiterhin ersichtlich, dass hohe Arsenaufnahmen auch zu einer hohen Akkumulation führen. In der eigenen Arbeit deutete sich dieser Effekt in den Geweben der Mutterschafe an. Dennoch erhielten die laktierenden Mutterschafe nicht nur eine höhere Menge an Arsen gegenüber den hochtragenden Müttern, sondern sie nahmen auch über einen 8 Wochen längeren Zeitraum Arsen auf. Daher kann nicht genau differenziert werden, ob die Arsenkonzentrationen in den Geweben in Abhängigkeit von der Höhe oder von der Dauer der Arsensupplementation leicht erhöht waren. Bei den Lämmern der ersten Untersuchung von BUCY *et al.* (1954) waren, wie bereits erwähnt, die Unterschiede in der Höhe der Arsenaufnahme zu gering, um sich eindeutig in der Höhe der Arsenkonzentration in den Organen widerspiegeln zu können.

PEOPLES (1964) untersuchte die Abreicherung von Arsen aus den Geweben bei Rindern im Anschluss an eine 8-wöchige Zufütterung von Arsensäure in der Dosis von 1,25 mg/kg LM (entspricht 0,7 mg As/kg LM) und konnte nach 15 Tagen des Arsenentzuges in der Leber noch 0,2 mg As/kg T und in Niere und Muskel < 0,05 mg As/kg T ermitteln. In der eigenen Untersuchung lag die Arsenszufuhr bei ca. 0,5 mg As/kg LM und die Anreicherung in diesen 3 Geweben war durchschnittlich doppelt so hoch, wie bei PEOPLES (1964) nach der 8-wöchigen Arsensäure-Zufuhr. Die Unterschiede resultieren womöglich aus der Individualität der Tierspezies und der Unterschiedlichkeit der eingesetzten Verbindungen. Ein signifikanter Einfluss des Geschlechtes auf eine unterschiedlich starke Akkumulation von Arsen in den Geweben wurde in einer Untersuchung von MIRANDA *et al.* (2000) an Kälbern nicht bestätigt.

Die in einem 4 Wochen alten Lamm gemessene Arsenkonzentration von 0,2 mg As/kg T in der Leber kann nur auf einen Messfehler zurückgeführt werden, da eine Aufnahme von Arsen durch ein Lamm der Kontrollgruppe ausgeschlossen werden kann.

Plazenta

Die Einlagerung von Arsen in die Plazenta war vergleichsweise hoch. Das Verteilungsregime des Arsens in der Plazenta wurde bisher nicht untersucht. Es ist möglich, dass das Arsen zum Teil aus den Blutanteilen stammte, aber auch eine Einlagerung in das Bindegewebe des Chorions wäre denkbar. JANDER *et al.* (1981) identifizierten in der bovinen Plazenta ein cysteinreiches Kollagen. Möglicherweise konnte Arsen hier an den Thiolgruppen des Cysteins gebunden werden, solange diese nicht zu Disulfidbrücken vernetzt waren. Die plazentare Übertragung von Arsen aus dem mütterlichen in das embryonale Blut über eine Passage der Plazentaschranke wurde, wie schon erwähnt, bereits in Untersuchungen am Hamster und Mäusen nachgewiesen.

Milch

Die großen Unterschiede im Arsengehalt der Kolostralmilch und der reifen Milch begründen sich einerseits in der Aufkonzentrierung der Inhaltsstoffe durch den höheren Trockenmassegehalt in der Kolostralmilch von durchschnittlich 20 % gegenüber der reifen Milch mit durchschnittlich 16 % (HADJIPANAYIOTOU, 1995). Andererseits bedingte der höhere Gehalt an Rohproteinen im Kolostrum (7,1 vs. 5,8 %; HADJIPANAYIOTOU, 1995) einen potentiell größeren Anteil an Thiolgruppen und damit vermutlich auch eine erhöhte Bindungskapazität von Arsen, wodurch ein höherer Arsengehalt gegenüber der reifen Milch auftrat. ANTUNOVIĆ *et al.* (2005) ermittelten dagegen im Kolostrum von Mutterschafen einen signifikant geringeren Arsengehalt als in der reifen Milch. Durch Umrechnung der Trockenmassebasierenden Angaben konnten für diese Untersuchung – ausgehend von einer Trockenmasse von 16 % – 4 bis 4,6 µg As/l reifer Milch ermittelt werden. Auch unter Berücksichtigung des höheren Trockenmassegehaltes des Kolostrums war der Arsengehalt hier mit 2,2 µg As/l geringer als in der reifen Milch. Die Grundfuttermittel in diesem Versuch waren nicht mit Arsen belastet (< 0,03 mg As/kg T). Die Arsenkonzentrationen in der reifen Milch sind aber in Anbetracht der Variationsbreite verschiedener Einflussfaktoren wie Schafrasse, Futtermittel und Saisonabhängigkeit (JELINEK *et al.*, 1993) weitestgehend mit den Arsengehalten der Kontrollgruppe des vorliegenden Versuches vergleichbar. Bei ROSAS *et al.* (1999) konnte in einer natürlich kontaminierten Region Mexikos bei Rindern ein Transfer von Arsen aus dem Futter und Grundwasser in die Milch bewiesen werden. Die durchschnittliche Aufnahme von Arsen wurde gebietsabhängig auf 4 bis 39 mg As/d geschätzt und in der Milch ein Gehalt von 1,2 bis 8,9 µg As/l analysiert. SIMSEK *et al.* (2000) wiesen ebenfalls einen erhöhten

Arsengehalt (9 µg As/l) in der Milch von Rindern nach, die in einem Industriegebiet einer türkischen Provinz beprobt wurden, gegenüber Milchproben von Rindern einer ländlichen Gegend (2 µg As/l).

PEOPLES (1964) konnte nach einer 8-wöchigen Verabreichung von Arsensäure (0,7 mg As/kg LM) an Rinder keine signifikanten Unterschiede in der Arsenkonzentration der Milch gegenüber einer Kontrollgruppe feststellen.

In einer Untersuchung von CALVERT & SMITH (1980) mit laktierenden Milchkühen wurde durch die Verabreichung von 4,8 mg As/kg LM (= 2,63 g As/Tier und Tag) in der weniger toxischen organischen Form nach 28 Tagen eine Erhöhung der Arsenkonzentration in der Milch um fast 80 % von 0,09 auf 0,16 µg As/g gefriergetrocknetem Material festgestellt. Dies entsprach unter Berücksichtigung der Trockenmasse einem Anstieg des Arsengehaltes von 14 auf 26 µg As/l Milch. Im eigenen Versuch konnte ebenfalls durch die Aufnahme von Arsen eine Erhöhung der Arsenkonzentration in der Milch um den Faktor 2 bis 7 ermittelt werden. Die absoluten Arsenkonzentrationen waren jedoch viel geringer gegenüber denen im Versuch von CALVERT & SMITH (1980). Die Gehalte von Arsen in der Milch der Arsengruppen können aufgrund der unterschiedlichen Herkunft und Dosis der angewandten Arsenverbindungen zwar gegenübergestellt, jedoch nicht bewertet werden.

Eine angenommene mittlere tägliche Milchleistung von 1500 ml pro Tier würde rein rechnerisch bei einer durchschnittlichen Arsenkonzentration von 6,7 µg As/l Milch zu einem absoluten Arsengehalt von ca. 10 µg As/d in der Milch führen. Dies entspricht 0,02 % der täglich aufgenommenen Arsenmenge der Mutterschafe von 45,4 mg. Bei einer durchschnittlichen Milchaufnahme von 1000 ml pro Tag und Lamm ist eine Arsenaufnahme von ca. 6 µg abschätzbar. ANKE *et al.* (2005) konnten Mangelerscheinungen bei Ziegen feststellen, deren tägliche Arsenaufnahme < 35 µg As/kg T betrug und empfahlen zur Bedarfsdeckung einen Arsengehalt von maximal 50 µg As/kg T im Futter. Eine Übertragbarkeit auf das Schaf ist annehmbar. Bezüglich dieser kalkulierten Menge erscheint der Arsengehalt in der Milch von Mutterschafen mit erhöhter Arsenaufnahme allerdings sehr gering.

Im Muskel, in der Niere und Leber der Lämmer war nach der 4-wöchigen Laktationsphase weder in der Kontroll- noch in der Arsengruppe Arsen mit dem ICP-OES nachweisbar. Demnach nahm die Aufnahme von Arsen über die Milch keinen starken Einfluss auf den Arsengehalt dieser Gewebe.

Anhand von Untersuchungsergebnissen einer Beprobung eines Sortimentes an Milchprodukten von AYAR *et al.* (2009) wurde ersichtlich, dass viele Erzeugnisse einen natürlichen Arsengehalt von bis zu über 200 µg As/kg aufweisen können. Butter und Joghurt enthielten hierbei die höchsten Konzentrationen an Arsen. Quark und verschiedene Käsesorten wiesen dagegen geringere Mengen von < 100 µg As/l auf. Ausgehend von einer Arsenbelastung der laktierenden Rinder oder Schafe wäre eine Erhöhung des Arsengehaltes in Milchprodukten wahrscheinlich. Arsengehalte in ähnlichen Wertebereichen konnten auch durch ANKE *et al.* (2005) bestätigt werden. BORYS *et al.* (2006) konnten in Produkten aus Schafsmilch dagegen kein Arsen oberhalb der Nachweisgrenze von 70 µg As/kg analysieren.

Schätzwerte zu Arsenkonzentrationen bei der Aufkonzentrierung von Arsen im Zuge der Käseherstellung aus kontaminierter Milch sind nur schlecht kalkulierbar, da ein Teil des Arsens möglicherweise auch an den Thiolgruppen des Cysteins im Molkenprotein gebunden ist, welches bei der Herstellung mit der Molke als Nebenprodukt abgeführt wird. Anhand der Messwerte wird jedoch ersichtlich, dass in der Milch nur eine sehr geringe Konzentration an Arsen enthalten ist.

10.3 Spezifische Enzymaktivitäten

Die Ergebnisse zeigten, dass die Arsenaufnahme der Tiere einen gewissen Einfluss auf die Aktivität der Pyruvatkinase in der Leber, in der Niere und im Muskel hatte. In vielen Fällen, und hauptsächlich bei Lämmern der Kontrollgruppe, die von der 5. bis zur 8. Lebenswoche in der „cross-over“-Behandlung Arsen aufnahmen, war ein stimulierender Einfluss des Arsens auf die Pyruvatkinaseaktivität ersichtlich. In allen 3 Geweben konnte hier eine nominale oder signifikante Erhöhung der Pyruvatkinaseaktivität ermittelt werden gegenüber den Lämmern der Kontrollgruppe, die Konzentrat ohne Arsenzusatz aufnahmen. In der Arsengruppe unterschieden sich die Pyruvatkinaseaktivitäten in der Leber, in der Niere und im Muskel zwischen den 8 Wochen alten Lämmern mit und ohne Arsenaufnahme nicht. Eine Vergleichbarkeit der Pyruvatkinaseaktivität zwischen den 8 Wochen alten Lämmern der Kontrollgruppe und den 8 Wochen alten Lämmern der Arsengruppe der „cross-over“-Behandlung, die beide von der 5. bis zur 8. Lebenswoche Konzentrat ohne Arsenzusatz erhielten, war nicht gegeben. Dies traf ebenso im Vergleich der Pyruvatkinaseaktivitäten in den Geweben der 8 Wochen alten Lämmer der Arsengruppe und den 8 Wochen alten Lämmern der Kontrollgruppe aus der „cross-over“-

Behandlung zu, die wiederum beide Konzentrat mit Arsenzusatz erhielten. Die Gründe hierfür sind unklar. Möglicherweise spielte hier eine Vorbelastung der Lämmer der Arsengruppe über die Muttermilch – wenn auch in sehr geringem Maße – eine Rolle. Der teilweise stimulierende Einfluss des Arsens auf die Pyruvatkinaseaktivität bei den Lämmer spiegelte sich auch bei den Mutterschafen wider. Hier war die Pyruvatkinaseaktivität der Tiere der Arsengruppe nominal (Niere und Muskel) oder signifikant (Leber) höher als in der Kontrollgruppe.

Die Stimulation der Pyruvatkinase könnte auf dem bereits erwähnten Mechanismus der „Arndt-Schulz’schen Regel“ beruhen. In einer *in vitro*-Untersuchung von HU *et al.* (1998) wurden ähnliche Erkenntnisse bei Enzymen der DNA-Reparatur gewonnen. Millimolare Dosen an Arsenit führten hier zu einer Steigerung der Aktivität verschiedener Enzyme, wobei die Ursache auf Ebene der Transkription (Bindung am Zinkfinger-Element) oder der posttranslationalen Phosphorylierung (durch Arsenat) vermutet wurde.

Die Aktivität der Hexokinase und Glukokinase im Muskel, in der Leber und in der Niere der Lämmer wurde durch Arsen eher in ungerichteter Weise beeinflusst. Teilweise waren die Enzymaktivitäten durch die Aufnahme von Arsen erhöht, teilweise vermindert. Daneben spielte möglicherweise auch der Faktor „Einzel- oder Zwillingslamm“ eine Rolle. Bei den Mutterschafen führte die Arsenaufnahme aber fast ausschließlich zu nominal oder signifikant höheren Enzymaktivitäten in den 3 Geweben gegenüber der Kontrollgruppe.

Entsprechend der Wirkungsweise des Arsens wurde eine gegenteilige Reaktion erwartet. Eine Aktivitätshemmung diverser Enzyme durch Arsen wurde bereits vielfach nachgewiesen:

- β -Ketoacyl-CoA- und Acetoacetyl-CoA-Thiolase (β -Oxidation), sowie Enzyme der Ketogenese (REIN *et al.*, 1979)
- Glutamat-Oxalacetat- und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (Proteinstoffwechsel), sowie die GSH-Peroxidase, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Cholinesterase (SHEABAR & YANNAI, 1989)
- Glukose-6-Phosphatase (PAL & CHATTERJEE, 2005)
- Pyruvat-Oxidase, Carboxylase, α -Ketoglutarat-Oxidase, Malat-Oxidase, Succinat-Oxidase, Alkohol-Oxidase (BARRON & SINGER, 1945)
- Pyruvat-Dehydrogenase (PETRICK *et al.*, 2000)

Allerdings wurde in diesen Untersuchungen vorwiegend *in vitro* gearbeitet unter Verwendung von tierischem Gewebe oder Zellkulturen. Die arsenhaltigen Verbindungen wurden hier erst kurz vor der Aktivitätsmessung dazu gegeben. Dagegen injizierten REICHL *et al.* (1989) Meerschweinchen Arsen peritoneal und schlussfolgerten anhand der ermittelten Substratkonzentrationen des Kohlenhydratmetabolismus in der Leber eine starke Hemmung der Pyruvat-Dehydrogenase. In einer weiteren Studie an Ratten, denen ebenfalls Arsen intraperitoneal injiziert wurde (über 30 d, 5,55 mg As/kg LM), konnten ähnliche Erkenntnisse gewonnen und zusätzlich eine Hemmung der Glutamat-Oxalacetat- und Glutamat-Pyruvat-Transaminase in der Niere und Leber nachgewiesen werden (PAL & CHATTERJEE, 2005). Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Arsenkonzentration von umgerechnet maximal 0,7 mg As/kg LM war wahrscheinlich zu gering, um eine Hemmung der Enzyme *in vivo* zu erreichen.

BARRON & SINGER (1945) nahmen eine Einteilung verschiedener Reagenzien bezüglich ihrer Stärke der Reaktivität mit Thiolgruppen von Enzymen vor (Gruppe 1 bis 3; schwach bis stark oxidierende Wirkung). Arsen wurde dabei der Gruppe 3 zugeordnet, als Reaktionspartner sämtlicher verfügbarer Thiolgruppen im nativen Protein. Die Schädigung vieler Enzyme ist jedoch reversibel. Sie können durch die Zugabe von Dimercaprol (British Anti Lewisite; FLUHARTY & SANADI; 1960), des entsprechenden Substrates (REIN *et al.*, 1979) oder von Glutathion (BARRON & SINGER, 1945) wieder reaktiviert werden. Dazu liegen bisher keine Untersuchungen für die Pyruvatkinase und die Hexokinase vor. Anhand der Aminosäuresequenz der Hexokinase wird ersichtlich, dass dieses Enzym eine relativ große Menge an Cystein aufweist (SCHWAB & WILSON, 1991, Abb. A4), an dessen Thiolgruppen das Arsenit binden könnte. Die Pyruvatkinase weist dagegen im Allgemeinen weniger Cystein in der Struktur auf (Abb. A5), wenn auch mit tierindividuellen Unterschieden (MUIRHEAD *et al.*, 1986). Dennoch wurde, wie bereits in der Literaturübersicht erwähnt, durch verschiedene mit den Thiolgruppen interagierende Substanzen eine Aktivitätsbeeinträchtigung dieser beiden Enzyme durch verschiedene Autoren nachgewiesen werden (GRIFFITHS, 1949; LAZARUS *et al.*, 1968; OTIENO *et al.*, 1975; FELL *et al.*, 1974). Eine Hemmung der Hexokinaseaktivität durch Arsenit wurde weiterhin in einer *in vitro*-Untersuchung mit Zellkulturen (Hundeniere) untersucht, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (LIEBL *et al.*, 1992).

Eine Hemmung der Hexokinase- und auch Glukokinase-Aktivität würde bereits im Anfangsstadium der Energiegewinnung aus Glukose zu einer verminderten Anzahl an

Zwischenmetaboliten führen und letztendlich in einer ungenügenden Auslastung der Folgereaktionen resultieren, eventuell sogar in einer Stagnation der Produktion energiereicher Phosphate. Durch eine Hemmung der Aktivität der Pyruvatkinase wäre eine Bereitstellung von Pyruvat und folglich auch Acetyl-CoA möglicherweise vermindert. Dies könnte ebenso mit einer Beeinträchtigung des Citratzyklus einhergehen, wie auch mit einer Beeinträchtigung der Fettsäuresynthese und der Steroidhormonbildung aus Acetyl-CoA.

Eine Regulierung der Pyruvatkinase, Hexokinase und Glukokinase findet auf genetischer und metabolischer Ebene statt (REHNER & DANIEL, 2002). In der Leber beispielsweise wirkt Fruktose-1,6-Bisphosphat als allosterischer Ligand aktivierend auf die Pyruvatkinase. Adenosintriphosphat (ATP), Alanin, Acetyl-CoA, sowie eine Phosphorylierung des Enzyms wirken dagegen hemmend auf dessen Aktivität. Auf Ebene der mRNA-Expression wirken beispielsweise Insulin und Glukose stimulierend, cAMP wiederum hemmend. In gleicher Weise wird die Expression der Glukokinase in der Leber reguliert, mit Ausnahme der stimulierenden Wirkung von Glukose. Die Aktivität der Hexokinase wird durch dessen Produkt Glukose-6-Phosphat gehemmt. Hexokinasen treten in 4 verschiedenen Isoformen (Hexokinase I, II, III, IV = Glukokinase) auf. Im Muskel ist hauptsächlich die Hexokinase II vertreten, deren Transkription durch Insulin induziert wird (WILSON, 1995). In der Leber ist es, wie erwähnt, die Glukokinase, deren mRNA-Synthese durch Insulin stimuliert wird, wobei aber die Translation – getestet an diabetischen Ratten – einige Stunden verzögert eintritt (IYNEDJIAN *et al.*, 1988). Auch die Pyruvatkinase existiert in 4 verschiedenen Isoformen (L-, R-, M₁ und M₂-Pyruvatkinase), die gewebespezifisch exprimiert werden. In der Leber, und in geringerem Maße auch in der Niere, existiert neben der M₁-Isoform hauptsächlich die L-Pyruvatkinase, während die M₁-Pyruvatkinase der typische Vertreter im Muskel ist (TANAKA *et al.*, 1967; YAMADA & NOGUCHI, 1999). Das Level der L-Isoform kann in Abhängigkeit von hormonellen und nutritiven Faktoren stark variieren, im Gegensatz zur M₁-Isoform, dessen Level sich nur leicht verändert (TANAKA *et al.*, 1965 und 1967). Diese Faktoren (z. B. Insulingabe bei diabetischen Ratten, Glukagongabe, Glukose-, Fruktose-, Glycerolgabe) regulieren daher zwar gewebespezifisch die mRNA-Synthese der Pyruvatkinase, wirken in der Leber jedoch am stärksten (YAMADA & NOGUCHI, 1999; MUNNICH *et al.*, 1987). Ein Einfluss der morgendlichen Fütterung auf die Enzymaktivitäten kann zwar nicht ausgeschlossen werden, scheint jedoch von untergeordneter Rolle zu sein. Die Schlachtungen fanden direkt im Anschluss an die

Fütterung statt, sodass für eine eventuelle Stimulation der mRNA-Synthese durch Insulin bis hin zur Translation und Arbeit der Enzyme nur ein begrenzter Zeitrahmen gegeben war. Die postprandiale Insulinsekretion beim Wiederkäuer wird auch vermutlich weniger durch den Blut-Glukose-Spiegel, sondern vorrangig durch im Pansen synthetisierte, freie kurzkettige Fettsäuren stimuliert (BASSETT, 1978). Mit der Silage erhielten die Tiere ein Futter, welches vermutlich relativ arm an Mono- und Disacchariden war. Dadurch wäre auch die mikrobielle Synthese kurzkettiger Fettsäuren im Pansen relativ gering gewesen, sodass ein bedeutender Einfluss von Insulin auf die Enzymexpression wahrscheinlich nicht gegeben war.

Aufgrund der Aufnahme von Muttermilch durch die Lämmer vor der Schlachtung, die zum abblammungsnahen Zeitpunkt oder mit 4 Wochen geschlachtet wurden, wäre hier schon eher ein Einfluss auf die Insulinsekretion denkbar. Die Synthese von kurzkettigen Fettsäuren im Pansen spielt jedoch in den ersten Lebenswochen kaum eine Rolle. Die Laktose der Muttermilch wird im Darm zu Glukose und Galaktose abgebaut. Ob in diesem Lebensalter die Insulinsekretion noch durch den Blutglukosespiegel stimuliert wird, ist unklar.

Denkbar wäre auch, dass die Expression der Enzyme in der Arsengruppe durch den Gewöhnungseffekt in höherem Maße stattfand, wobei ein geringer Anteil der Enzyme möglicherweise durch die Bindung von Arsen inaktiviert wurde, sodass die Stoffumsetzungen trotzdem im „normalen“ Bereich lagen. Durch den Zusatz von Dithiothreitol bei der Enzymanalytik wäre folglich denkbar, dass das an den Thiolgruppen der Enzyme gebundene Arsen wieder abgespalten wurde, was wiederum zu einer Reaktivierung der Enzyme führte und somit zu höheren Aktivitäten in den Geweben der Tiere in der Arsengruppe. Laut des eigenen Versuches zur Überprüfung des Einflusses von Dithiothreitol konnten jedoch keine Unterschiede festgestellt werden.

Durch den Bezug der Enzymaktivität auf den Proteingehalt wäre auch eine Verschiebung des Verhältnisses der Gehalte an Protein zum Enzym vorstellbar ohne eine direkte Aktivitätserhöhung. Veränderungen durch Arsen im Aminosäurestoffwechsel wurden bereits beschrieben (PAL & CHATTERJEE, 2005). Da die Enzymsynthese genetisch geregelt wird und hier bisher kein Einfluss des Arsens beschrieben wurde, könnte diese im normalen Umfang stattgefunden haben, die Proteinsynthese durch Um-, Auf- und Abbau von Strukturprotein jedoch durch Arsen beeinflusst worden sein. Eine Überprüfung des Proteingehaltes in der Frischmasse der Gewebe wies jedoch nicht auf Unterschiede zwischen den Gruppen hin.

Ein Vergleich der ermittelten Aktivitäten der Enzyme mit anderen Untersuchungen ist hier nicht möglich, da ein analoger Versuch bisher nicht durchgeführt wurde und sowohl die Höhe, Art, und der Applikationsweg des Arsens, als auch die Tierart und dessen Ernährung auf die Aktivität der Enzyme Einfluss nehmen. Eine Vergleichbarkeit zu anderen ähnlichen Versuchen ist somit nicht gegeben. Daneben kann auch die Art der Gewebeaufbereitung und Aktivitätsmessung zu weiteren Unterschieden führen, die einen Vergleich zwischen Ergebnissen verschiedener Untersuchungen nur schwer zulassen.

Anliegen der Enzymaktivitätsmessung in dieser Arbeit war es, einen möglichen Einfluss der Arsenzulage zu untersuchen. Das primäre Ziel des Versuches mit den Mutterschafen war jedoch die Überprüfung der Höhe der Akkumulation von Arsen in Geweben. Bei der gewählten Anzahl an Wiederholungen (vorrangig $n=3$) könnten nur bei großen Unterschieden zwischen den Enzymaktivitäten beider Gruppen eindeutige Aussagen zu einer Wirkung des Arsens getroffen werden. Der hier nachgewiesene Effekt des Arsens soll aufgrund der geringen Anzahl an Wiederholungen (teilweise auch nur $n=2$) nicht überbewertet, aber dennoch als Hinweis auf eine Wirkung zur Kenntnis genommen werden.

11 Schlussfolgerung und Bewertung der Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, Auswirkungen einer Aufnahme von arsenbelastetem Grünfütter oder dessen Konservaten durch den Wiederkäuer zu überprüfen. Dies erfolgte am Modelltier Schaf unter Anwendung verschiedener *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungsansätze. Anhand dieser Ergebnisse sollte auch die Möglichkeit eines Eintrags von Arsen in die Nahrungskette des Menschen durch tierische Produkte betrachtet werden.

In den durchgeführten *in vitro*-Versuchen (Gasbildungsdynamik, Pansensimulation) wurden vereinzelt Effekte nachgewiesen. Diese waren jedoch eher unspezifisch und wurden hauptsächlich zwischen den Varianten (Arsentrioxid und Na-Arsenat) mit unterschiedlichen Arsenkonzentrationen beobachtet. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde ebenfalls nicht festgestellt. Die Verfügbarkeit von Arsen aus der Erde bzw. die Konzentrationen an Arsenat und Arsenit waren scheinbar nicht hoch genug, um Effekte in den Mikroben zu erzielen. Denkbar wäre hier auch die Entwicklung von Toleranzmechanismen. Der eingemischte Erdeanteil von 6 %, bezogen auf die Originalsubstanz im Versuch zur Gasbildungsdynamik, ist durchaus vergleichbar mit dem Anteil an Bodenpartikeln, den die Tiere aufnehmen, wenn ihnen maschinell geborgenes Grünfütter bzw. dessen Konservate vorgelegt werden. In Abhängigkeit von der Schmitthöhe und vom Verschmutzungsgrad bei der Bergung von Grünfütter kann dieser Anteil jedoch variieren. Weidende Schafe nehmen dagegen mit einem Anteil von bis zu 30 % der Gesamtrockenmasse des Futters eine wesentlich höhere Menge an Bodenpartikeln auf (ABRAHAMS & STEIGMAJER, 2003). Die Höhe des Arsengehaltes der Erde ist aber hierbei ebenso zu berücksichtigen. Die im Versuch eingesetzte Erde enthielt fast 170 mg As/kg Originalsubstanz. Vor dem Hintergrund des Grenzwertes von 2 mg As/kg Futter (88 % T) nach der Futtermittelverordnung (EG-Richtlinie 2002/32) und der analysierten Arsenkonzentration in den eingesetzten Futterproben inklusive Erde im Versuch zur Gasbildungsdynamik (11 bis 12 mg As/kg T), die diesen Grenzwert um das 5,5- bis 6-fache überschreitet, sind die ermittelten Ergebnisse als positiv zu werten, auch wenn diese nicht uneingeschränkt auf den lebenden Organismus übertragen werden können. Dies gilt ebenso für die Versuche, in denen synthetische Arsenverbindungen eingesetzt wurden, deren Verfügbarkeit und Konzentration durchaus höher waren (bis 50 mg As/kg T) gegenüber dem Arsen in der zugesetzten Erde. Ein Einfluss der Arsenzulage auf die Effizienz der mikrobiellen Proteinbiosynthese und auf das mikrobielle Aminosäurenmuster

konnte in der Pansensimulation ebenfalls nicht festgestellt werden. Auch wenn hier kein Unterschied in der toxischen Wirkung zwischen Arsenit und Arsenat nachgewiesen wurde, ist es trotzdem denkbar, dass durch das anaerobe Milieu im Pansen aufgenommenes Arsenat zu Arsenit reduziert wird, welches laut Literaturangaben toxischer ist.

Da *in vitro*-Versuche zum Einen Hinweise auf eine Wirkung geben können, auf der anderen Seite eine Übertragbarkeit auf das Tier aber nur bedingt möglich ist, wurden unter Verwendung von arsenhaltiger Erde und arsenhaltigem Konzentrat Versuche zur Ermittlung der Rohrnährstoffverdaulichkeit und des Verbleibes von Arsen an Hammeln durchgeführt. Die Verdaulichkeit einiger Rohrnährstoffe wurde sowohl durch die Zulage von arsenhaltiger Erde als auch durch das Arsen im Konzentratfutter beeinflusst. Eindeutige Effekte auf die Verdaulichkeit eines bestimmten Rohrnährstoffes wurden aber wiederum nicht festgestellt. Da die rechnerisch ermittelten Differenzen zwischen der aufgenommenen und ausgeschiedenen Arsenmenge um den Nullwert schwankten, kann davon ausgegangen werden, dass der größte Teil des aufgenommenen Arsens wieder über den Harn und Kot ausgeschieden wurde. Die renale Exkretion von Arsen bewies eine Aufnahme in den Blutkreislauf und birgt damit das Risiko einer Aufnahme von Arsen in die Gewebe. Die Ausscheidung von Arsen über den Kot war nach circa 10 Tagen nach der letzten Aufnahme von Arsen nahezu abgeschlossen. Die hohen Arsengehalte im Kot von 60 bis 86 % des aufgenommenen Arsens in Abhängigkeit von der Arsenquelle und der Art der Ration weisen auf eine mäßige Absorption des Arsens aus dem Futter hin. Durch die Ausscheidung arsenhaltiger Exkreme und den Eintrag in die Umwelt (Weiden, Dungstreuen) schließt sich der Kreislauf.

Zur Minimierung der Arsenkonzentration (und auch anderer Schwermetalle) im Futter wurden von der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft Empfehlungen für den Landwirt herausgegeben (LfL, 2006), z.B.:

- Einstellung des Boden-pH auf 5,8 bis 6,5
→ zur Verringerung des Schwermetalltransfers in die Pflanze
- Phosphordüngung zu Beginn der Vegetationsperiode
→ Konkurrenz zwischen Phosphor und Arsen bei der Aufnahme durch die Wurzel
- Änderung der Grünlandzusammensetzung durch Nachsaat entsprechender Gräser
→ Gräser nehmen gegenüber Wiesenkräutern weniger Schwermetalle auf
- Verminderung der Verschmutzung des Futters mit Bodenpartikeln (beispielsweise durch Mähen mit größerer Schnitthöhe, Vermeidung von Staubeentwicklung beim

Transport, im Fahrsilo Überfahren des Futters nur mit sauberen Schlepperreifen, Mahd möglichst bei abgetrocknetem Pflanzenbestand, Verzicht auf Beweidung von Ackerfutter bei nasser Witterung, Rüben nur gewaschen Verfüttern oder Ausweichen auf Silomais oder Klee gras)

Bei Beachtung dieser Empfehlungen bei der Futterbergung bzw. Beweidung, einem mäßigen Verzehr tierischer Produkte, stammend aus den betroffenen Gebieten oder möglicherweise sogar einer Fütterung von unkontaminiertem Futter 2 bis 3 Wochen vor der Schlachtung ist die Gefahr gesundheitlicher Schäden durch Arsen für den Konsumenten als äußerst gering einzustufen.

Die Aufnahme von Arsen in den Blutkreislauf und damit die Möglichkeit einer Akkumulation in den tierischen Geweben wurde in einem Langzeitversuch mit Mutterschafen untersucht. Eine Anreicherung des Arsens in verschiedenen Organen und im Muskel, in Wolle und Horn, sowie in Serum und Milch wurde nachgewiesen. Aufgrund der Nutzungsart von Wolle und Horn bzw. deren Ausgliederung aus der Nahrungskette ist davon auszugehen, dass hiervon keine direkte Gefahr für den Menschen ausgeht. Wesentlich bedeutungsvoller war die Untersuchung der Arsenanreicherung in der Leber, Niere, im Muskel und in der Milch, da diese für den menschlichen Verzehr bestimmt sind. Hierbei besteht die Gefahr eines Eintrags in die Nahrungskette und damit eine direkte Gesundheitsgefährdung.

Die maximal tolerierbare Grenze für die Aufnahme von anorganischem Arsen durch Nutztiere wurde trotz Unterschieden zwischen den einzelnen Nutztierspezies auf 50 mg As/kg Futter festgelegt (NRC, 1980). Nicht-Wiederkäuer gelten dabei als empfindlicher als Wiederkäuer (RINGER, 1989; FLACHOWSKY, 2006). Die Toleranz gegenüber Arsen ist dabei von verschiedenen Faktoren abhängig, die bereits in der Einleitung benannt wurden. Bei der Festlegung dieses Grenzwertes ging man jedoch lediglich von schädlichen Effekten für das Tier aus, ohne Berücksichtigung der Höhe der Akkumulation in den Geweben und dem damit einhergehenden Risiko des Eintrages in die Nahrungskette. Die im eigenen Versuch eingesetzte Arsen-Konzentration von 16 bis 20 mg As/kg führte nicht zu offensichtlichen Schäden am Tier (z.B. Entzündung der Schleimhäute, Diarrhö, Ekzeme, Abmagerung, unkoordinierte Gangart; SELBY *et al.*, 1974). Ein Einfluss des Arsens auf das Hämatokrit, den Hämoglobin- und Erythrocytengehalt konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Der Gehalt an Leukocyten lag in der Arsengruppe über den

gesamten Versuchszeitraum generell auf einem höheren Niveau gegenüber der Kontrolle. Daneben wurde ein Einfluss der Zeit/Versuchsdauer auf die Blutparameter nachgewiesen. Dies wurde auf die Trächtigkeit zurückgeführt. Die hier applizierte Arsenmenge führte zu einer leichten Stimulation der Aktivität der Pyruvatkinase, jedoch kaum zu Veränderungen in der Hexokinase- und Glukokinaseaktivität.

Es ist nicht eindeutig differenzierbar, ob die Arsenkonzentration in den Organen der Tiere von der Höhe oder von der Dauer der Arsensupplementation abhängig war. Bei den Lämmern bestand in der vorliegenden Untersuchung kein Zusammenhang zwischen der aufgenommenen absoluten Arsenmenge und der Höhe der Arsenkonzentration in der Leber, Niere und im Muskel. Ähnliche Erkenntnisse machten auch BUCY *et al.* (1954). Sie stellten jedoch in einer weiteren Untersuchung mit Lämmern und Mutterschafen fest, dass eine sehr hohe Arsenaufnahme auch zu sehr hohen Arsenkonzentrationen in den Organen führt (BUCY *et al.*, 1955). Möglicherweise stellt sich in diesen Geweben ein Gleichgewicht zwischen der aufgenommenen und akkumulierten Menge an Arsen ein. Jedoch scheint deren Speicherkapazität begrenzt zu sein, sodass eine erhöhte Arsenaufnahme nur bis zu einem gewissen Grad (bis zum Erreichen eines Plateaus in der Akkumulation) auch zu erhöhten Arsenkonzentrationen in den Geweben führt. Mit der Höhe der aufgenommenen Arsenmenge steigt auch das Risiko physiologischer Beeinträchtigungen und organischer Schäden. Daneben akkumulierten Lämmer einen größeren Teil des aufgenommenen Arsens in den Organen gegenüber den Mutterschafen.

Der PMTDI-Wert (Provisional Maximum Tolerable Daily Intake; 1988 bestätigt und umgewandelt in den Provisional Tolerable Weekly Intake) für Arsen liegt nach der JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) bei 2 µg As/d und kg Körpergewicht (KG) für den Menschen (Tab. 38; WHO, 1983). Dieser Wert gibt die maximale tolerierbare tägliche (PMTDI) bzw. wöchentliche (PTWI) Aufnahme eines Stoffes an, in diesem Fall zur Verhinderung einer kanzerogenen Wirkung. Aus Rücksicht auf sensibler reagierende Menschen setzten andere Organisationen bei der Ableitung der tolerablen Höhe einer chronischen täglichen Arsenaufnahme für eine nichtkanzerogene Wirkung (RfD = Reference Dose, TRD = Tolerierbare Resorbierte Dosis, MRL = Minimal Risk Level) aus dem NOAEL durch den Einsatz höherer Sicherheitsfaktoren wesentlich strengere Grenzen. (Der Wortlaut „nichtkanzerogene Wirkung“ wurde von der JECFA insofern gewählt, dass davon ausgegangen wurde, eine Tumorentwicklung würde nicht

stattfinden, solange auch keine anderen toxischen Effekte auftreten.) Das Umweltbundesamt (UBA; HASSAUER & KALBERLAH, 1999) schloss aber bei der Aufstellung des TRD-Wertes eine krebserregende Wirkung bei chronischer oraler Aufnahme durch sensibel reagierende Personen nicht aus.

Die Ermittlung und Ableitung dieser Grenzwerte basiert auf Daten verschiedener epidemiologischer Studien über die Arsenaufnahme aus kontaminiertem Trinkwasser (GRANTHAM & JONES, 1977; TSENG, 1977; TSENG *et al.*, 1968). Dadurch weichen die Vorgaben der JECFA von denen der anderen Organisationen ab. Der LOAEL gibt die niedrigste Dosis eines verabreichten chemischen Stoffes an, bei der im Tierversuch noch schädigende Wirkungen auftraten.

Tabelle 38: Tolerable Dosen für die chronische orale Aufnahme von Arsen (modifiziert nach SCHUHMACHER-WOLZ *et al.*, 2007)

Organisation	Bezeichnung	Tolerable Dosis für eine nicht- kanzerogene Wirkung ($\mu\text{g As/kg KG und d}$)	NOAEL	LOAEL
JECFA ^a	PMTDI	2	0,15 ⁺	1,5 ⁺
	PTWI	15		
U.S. EPA ^b	RfD	0,3	0,8	14
UBA ^c	TRD	0,3	0,8	14
ATSDR ^d	MRL	0,3	0,8	14

JECFA – Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, EPA – U.S. Environmental Protection Agency, UBA – Umweltbundesamt, ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry, PMTDI – Provisional Maximum Tolerable Daily Intake, PTWI – Provisional Tolerable Weekly Intake, RfD – Reference Dose, TRD – Tolerierbare Resorbierte Dosis, MRL – Minimal Risk Level for Chronic Oral Exposure, NOAEL – No Observed Adverse Effect Level, LOAEL – Lowest Observed Adverse Effect Level

Quellen: ^a WHO, 1983; ^b U.S. EPA, 2008; ^c HASSAUER & KALBERLAH, 1999; ^d ATSDR, 2007.

⁺Angabe in mg As/d

Bei der Risikoabschätzung anhand der Grenzwerte ist die Aufnahme von anorganischem Arsen von Bedeutung, da die organischen Formen in ihrer Toxizität als sehr gering eingestuft werden.

Die maximale tolerierbare Arsenaufnahme für eine nichtkanzerogene Wirkung bei einer chronischen Zufuhr beträgt laut JECFA für eine 75 kg schwere Person 150 $\mu\text{g As/d}$, laut der anderen Vereinigungen nur 22,5 μg . Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte

Arsenkonzentration in der Milch von 6,5 µg As/l stellt bei mäßigem Milchkonsum kein wesentliches Risiko für den Verbraucher dar. Beim Verzehr von 200 g Niere, 300 g Leber oder 400 g Muskelfleisch liegt die Arsenaufnahme bereits bei ca. 40 µg, errechnet anhand der eigenen ermittelten Daten. Damit wäre der aufgestellte Grenzwert der EPA, des UBA und der ATSDR überschritten. Bei gleichzeitigem Konsum von Milchprodukten, ebenfalls erzeugt von Wiederkäuern arsenbelasteter Regionen, könnte die Arsenaufnahme durchaus noch weiter steigen. Mit der Verwendung von Milch arsenbelasteter Tiere zur Herstellung von Molkereiprodukten bestände damit auch die Möglichkeit, den von der JECFA aufgestellten maximal tolerierbaren Wert für die tägliche chronische Arsenzufuhr zu überschreiten. Die JECFA weist zusätzlich ausdrücklich auf einen geringen Abstand des PTWI zu Dosen hin, die schädigende Effekte im Menschen hervorriefen (WHO, 1989). Wie bereits erwähnt, berücksichtigten die EPA, die ATSDR und das UBA bei der Kalkulation der tolerablen Dosis für eine nichtkanzerogene Wirkung auch sensibel reagierende Personen. Vor diesem Hintergrund scheint die Überschreitung des Grenzwertes, der durch die JECFA aufgestellt wurde, möglicherweise als kritisch, besonders für sensibel reagierende Menschen. Ein gesundheitliches Risiko für den Verbraucher besteht aber vermutlich vorrangig dann, wenn dauerhaft und nahezu täglich arsenbelastete Lebensmittel konsumiert werden. Der Verzehr tierischer Lebensmittel, erzeugt in arsenbelasteten Regionen, sollte dennoch nur in mäßiger Höhe stattfinden. Vor allem bei Kindern sollte er mit Bedacht erfolgen, zumindest wenn die Tiere nicht mindestens für 2 bis 3 Wochen unkontaminiertes Futter erhielten. In der vorliegenden Studie zur Abreicherung von Arsen war nach 12 Tagen kein Arsen mehr im Kot nachweisbar. Sicher spielt hier auch die Höhe der akkumulierten Arsenmenge eine Rolle. SELBY (1974) resümierten sogar einen Zeitraum von 6 Wochen für eine komplette Abreicherung und machten darauf aufmerksam, dass durch prä- oder postmortale Anzeichen einer Vergiftung ein Eintrag des Schlachtkörpers in die Nahrungskette nicht stattfinden würde. Die Gefahr einer höheren Arsenkonzentration in den Geweben besteht natürlich auch ohne sichtbare Vergiftungsanzeichen.

Ab einer chronischen Aufnahme von 14 µg As/kg KG und Tag (siehe LOAEL, Tab. 38) können sich neben der erhöhten Krebsinzidenz weitere schädigende Effekte einstellen. Eine Zufuhr dieser Mengen an Arsen über Milch- und Fleischereiprodukte scheint jedoch ausgeschlossen. Eine 75 kg schwere Person müsste dazu täglich ca. 1 mg Arsen zu sich nehmen, welches laut den eigenen Untersuchungsergebnissen in 1000 g Niere, 2000 g Leber oder 2500 g Muskelfleisch enthalten wäre.

Laut Forschungsergebnissen von WITTSIEPE *et al.* (2000) lag die durchschnittliche wöchentliche Arsenaufnahme 1- bis 6-jähriger Kinder aus Nordrhein-Westfalen bei 1,6 µg As/kg KG und damit weit unter der duldbaren wöchentlichen Aufnahmemenge (PTWI der WHO) von 15 µg As/kg KG. YOST *et al.* (1998) schätzten die Aufnahme von anorganischem Arsen bei U.S.-Bürgern unterschiedlicher Altersklassen auf 8,3 bis 14 µg As/d.

Der Grenzwert für Arsen im Trinkwasser in Deutschland liegt laut der Trinkwasserverordnung bei 10 µg As/l (DVGW, 2001). Für den Arsengehalt in Lebensmitteln existieren derzeit keine Höchstmengenangaben. Stattdessen wurden Richtwerte vom Bundesgesundheitsamt (BGA) bzw. dessen Nachfolgeinstitut, dem Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) veröffentlicht (letztmalig 1997), welche jedoch im Jahr 2000 aufgrund des Mangels an Aktualität der erhobenen Werte wieder zurückgezogen wurden (BgVV, 2000).

Die Einschätzung der Toxizität von tierischen Lebensmittel, die in arsenbelasteten Regionen gewonnen wurden, erfolgte anhand der im Versuch aufgenommenen Arsenmengen und -verbindungen und orientierte sich an der ermittelten Akkumulation von Arsen in den tierischen Geweben. Jedoch kann einerseits die Anreicherung im Tier geringfügiger ausfallen als im Versuch, da die Verfügbarkeit von Arsen aus der Erde gegenüber den hier eingesetzten synthetischen Verbindungen herabgesetzt ist. Andererseits kann die Arsenbelastung von Böden in einigen Regionen auch sehr hoch sein, sodass womöglich mit einer stärkeren Anreicherung, als im Versuch ermittelt, gerechnet werden kann.

Dem von der EU aufgestellten Grenzwert von 2 mg As/kg Futter (88 % T) (EG-Richtlinie 2002/32 EG) liegt scheinbar keine konkrete Studie zugrunde. Dennoch existiert dieser Wert bereits seit vielen Jahren. Eine Überarbeitung der für Arsen aufgestellten Höchstwerte für verschiedene Erzeugnisse, die zur Tierernährung bestimmt sind, erfolgte im April 2009 (European Commission, 2009). Anhand der *in vitro*-Versuche ist es nur schwer möglich, Rückschlüsse auf eine mögliche Höchstgrenze einer Arsenbelastung des Futtermittels zu ziehen. Einerseits unterscheidet sich die Verfügbarkeit des Arsens zwischen denen im Versuch verwendeten synthetischen Verbindungen und des im Futtermittel vorhandenen Arsens. Andererseits war eine eindeutige Wirkung der

Arsenzulage auf die Fermentation, im Sinne einer Hemmung oder Stimulation, weder in den Versuchen zur Gasbildung (bis 5 mg As/kg T als As^{3+} und bis 48 mg As/kg T als As^{5+} als synthetische Verbindungen; bis 12 mg As/kg T in der Erdezulage), noch im Versuch zur Pansensimulation (bis 20 mg As/kg T) erkennbar. Allerdings ist die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus *in vitro*-Versuchen eher schwierig, da sich die Versuchsgegebenheiten von *in vivo*-Bedingungen in gewissem Maße unterscheiden. Im hier durchgeführten Versuch mit Mutterschafen wurde die 10-fache Dosis des zulässigen Höchstgehaltes an Arsen im Futtermittel aufgenommen und eine Anreicherung in den Organen bzw. im Muskel der Tiere bis teilweise > 1 mg As/kg T ermittelt. Sicher war auch die Verfügbarkeit der hier eingesetzten Arsenverbindung günstiger im Gegensatz zu dem Arsen in der arsenhaltigen Erde als natürliche Kontaminationsquelle des Futters. Laut der vorliegenden Untersuchung würde die in der Leber, im Muskel oder der Niere akkumulierte Arsenmenge bei einer ständigen Aufnahme dieser tierischen Lebensmittel zu einer Überschreitung der tolerablen Dosis für eine nichtkanzerogene Wirkung laut U.S. EPA, UBA und ATSDR beim Menschen führen.

Eine geringfügige Überschreitung der Höchstmenge von 2 mg As/kg T im Futter würde (auch längerfristig) vermutlich keine Gefahr darstellen. Es ist aber zu beachten, dass mit einer höheren Trockensubstanzaufnahme auch die absolut aufgenommene Menge an Arsen steigt, z.B. in den Phasen der Trächtigkeit und Laktation.

Seit einiger Zeit wird an Verfahren geforscht, die es ermöglichen, Arsen kontrolliert aus kontaminierten Böden zu entfernen. Beispielsweise können Bakterien eingesetzt werden, um Arsen und auch Schwermetalle aus der wässrigen Umgebung auszufällen (Bio-Präzipitation). Dabei kommt es zur Bildung schwerlöslicher Arsen-Schwefel-Verbindungen, die im anaeroben Milieu stabil sind (UFZ, 2002). Weiterhin konnte durch das sogenannte Bio-Leaching mittels Bakterien Arsen im aeroben Milieu gezielt mobilisiert und anschließend aufgefangen werden. Auch Sanierungsmaßnahmen, bei denen Redoxprozesse systematisch durch Bewässerungs- und Belüftungsregimes beeinflusst werden können, wurden untersucht und angewendet. Hierbei soll einer Arsenmobilisierung entgegen gewirkt werden. Dennoch ist der Aufwand relativ hoch und die Situation der Arsenbelastung der Böden und den daraus resultierenden Risiken wird nicht von heute auf morgen beseitigt werden können.

12 Zusammenfassung

Geogene und anthropogene Ursachen führten in der Vergangenheit in einigen Regionen Sachsens zu erheblichen Kontaminationen von Böden mit Arsen. Fließgewässer und Überflutungen führen auch heute noch durch die weiträumige Verteilung von Bodenpartikeln zu Arsenkontaminationen von Grünlandflächen. Speziell an den Pflanzen anhaftende Erdpartikel führen häufig zu einer Überschreitung des Grenzwertes von Arsen im Futter. Insbesondere für Wiederkäuer besteht damit die Möglichkeit einer Arsenaufnahme.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Einfluss des Arsens auf den Roh Nährstoffabbau, die mikrobielle Aktivität und Proteinsynthese überprüft werden. Mit Hilfe von Versuchen am Schaf sollten weiterhin Erkenntnisse zur Ausscheidung und Akkumulation von Arsen gewonnen, sowie mögliche Einflüsse auf enzymatischer und hämatologischer Ebene untersucht werden. Anhand der gewonnenen Ergebnisse wurde auch das Risiko eines Eintrags von Arsen in die Nahrungskette des Menschen betrachtet.

In einem *in vitro*-Versuch zur Gasbildung wurde Grassilage mit Konzentratanteilen von 0, 20 oder 30 % und unter Zusatz einer arsenarmen oder arsenkontaminierten Erde mit Pansensaft inkubiert (max. 0,8 bzw. 11 bis 12 mg As/kg T). In einem weiteren Ansatz wurden die synthetischen Verbindungen Diarsentrioxid (Arsentrioxid) und Dinatriumarsenat Heptahydrat (Na-Arsenat) in Konzentrationen von 0, 2, 5, 10, 20 oder 50 mg As/kg T ebenfalls einer Grassilage zugesetzt. Arsentrioxid gilt hierbei als toxischer als Na-Arsenat. Das gebildete Gasvolumen wurde variantenabhängig erfasst, kumulativ gegen die Zeit aufgetragen und regressionsanalytisch ausgewertet. Die Zulage arsenkontaminierter Erde hatte keinen Einfluss auf das Gasbildungspotenzial. Die maximale Gasbildungsrate und der Zeitpunkt des Erreichens (Wendepunkt) waren gegenüber den Varianten mit arsenarmer Erde nur geringfügig verschieden. Lediglich in der Variante mit dem Konzentratanteil von 30 % bewirkte die Zulage der arsenkontaminierten Erde eine höhere maximale Gasbildungsrate und der Wendepunkt wurde 1,1 h früher erreicht. Durch den Zusatz der synthetischen Arsenverbindungen wurde in 2 Varianten mit Arsen ein höheres Gasbildungspotenzial gegenüber der Grassilage ohne Arsen ermittelt. Die maximale Gasbildungsrate lag bei allen Varianten im ähnlichen Bereich. Nur in der Na-Arsenat-Variante mit 50 mg As/kg T war diese etwas geringer. Die Zeit bis zum Erreichen des Wendepunktes stieg mit der Höhe der Zulage an Arsentrioxid und Na-Arsenat. Mit der Zulage von 50 mg As/kg T als Na-Arsenat trat der Wendepunkt zuerst ein.

Zur Überprüfung des Rohnährstoffabbaus und der mikrobiellen Proteinsynthese *in vitro* wurde ein Pansensimulationssystem verwendet. Hier wurde ein Einfluss des Arsens als Arsentrioxid und Na-Arsenat (0, 5, 20 mg As/kg T) bei der Inkubation einer Grassilage mit Pansensaft untersucht. Es konnten zwar zwischen den Varianten Unterschiede im Abbau der Rohnährstoffe gesichert werden, jedoch hatte die Arsenzulage gegenüber der Kontrollvariante in keinem Fall einen Einfluss. Auch die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese und das Aminosäuremuster des mikrobiellen Proteins blieben unbeeinflusst.

Verdaulichkeitsversuche mit Hammeln dienten der Überprüfung eines Einflusses von Arsen auf den Rohnährstoffabbau und der Untersuchung der Ausscheidung von Arsen. Dazu wurde eine arsenhaltige Erde bzw. ein Arsentrioxid-angereichertes Konzentrat (15 bis 17 bzw. 18,3 mg As/kg T in der Ration) eingesetzt. Der Zusatz von Erde zu einer Ration aus Grassilage bewirkte eine signifikant geringere Verdaulichkeit der Rohfaser. In Rationen aus Grünfutter oder Heu bewirkte die Erde eine signifikant geringere Verdaulichkeit von Rohprotein. Die mittlere tägliche Ausscheidung von Arsen über Kot und Harn betrug in der Arsengruppe 67 bzw. 33 %. Die Differenz zwischen aufgenommenem und ausgeschiedenem Arsen konnte nicht exakt erfasst werden. Die Aufnahme von Arsentrioxid-angereichertem Konzentratfutter führte bei einer Ration aus Heu, Grassilage und Stroh zu einer signifikant höheren Verdaulichkeit der Rohfaser. Arsen wurde im Mittel zu 81 % über den Kot ausgeschieden, zu 19 % über den Harn. Die Differenzen zwischen aufgenommenem und ausgeschiedenem Arsen waren gering. Innerhalb von 6 Tagen nach Ende des Verdaulichkeitsversuches sank die Arsenkonzentration im Kot von anfangs im Mittel 43 mg As/kg T auf < 1mg As/kg T.

In einem Versuch mit tragenden Mutterschafen wurde über 5 Monate ein arsenhaltiges Konzentrat verfüttert (15 bis 20 mg As/kg T in der Ration). Einer Kontrollgruppe wurde ein Konzentrat ohne Arsenzusatz verabreicht. Alle vier Wochen wurden Blut/Serum, Horn (Klaue) und Wolle beprobt, zur Ablammung Kolostrum und Plazenta, sowie alle zwei Wochen ab der Geburt Milch. Weiterhin wurden bei Schlachtungen die Niere, die Leber und Muskelgewebe beprobt. Bei Muttertieren fanden diese zu Versuchsbeginn, zur Ablammung und 8 Wochen nach der Ablammung statt. Ebenfalls zur Geburt, sowie 4 und 8 Wochen danach wurden je Gruppe 3 Lämmer geschlachtet. Die Lämmer erhielten nach einer 4-wöchigen Säugeperiode für 4 Wochen entweder variantengetreu Konzentrat oder Konzentrat der anderen Gruppe. Die Arsenbehandlung nahm keinen Einfluss auf die Blutparameter Hämoglobin, Erythrocyten und Hämatokrit der Mutterschafe. Der Leukocytengehalt lag in der Arsengruppe jedoch stets auf höherem Niveau. Die

Arsenkonzentration im Serum von Müttern und Lämmern der Arsengruppe war höher als in der Kontrollgruppe. Kolostralmilch enthielt in beiden Gruppen mehr Arsen als die reife Milch, deren Arsengehalt (trotz Unterschieden zwischen Arsen- und Kontrollgruppe) $< 8 \mu\text{g As/l}$ betrug. Wolle und Horn wiesen die höchsten Konzentrationen an Arsen auf (3 bis 4 mg As/kg T bei Müttern und Lämmern der Arsengruppe). 8 Wochen nach der Ablammung wurde in den Organen 1 mg As/kg T in der Niere und jeweils $0,5$ und $0,4 \text{ mg As/kg T}$ in der Leber und im Muskel der Mütter gemessen. Zum Zeitpunkt der Geburt und 4 Wochen nach der Geburt wurde in keinem der Organe der Lämmer Arsen nachgewiesen. Erst nach Aufnahme des arsenhaltigen Konzentrates über 4 Wochen wurden hier Arsenkonzentrationen in ähnlicher Höhe wie bei den Müttern ermittelt. Plazenten wiesen eine mittlere Arsenkonzentration von $2,6 \text{ mg As/kg T}$ auf. Die Aufnahme von arsenhaltigem Konzentrat führte bei Mutterschafen und Lämmern (im Alter von 4 und 8 Wochen) häufig zu höheren Pyruvatkinaseaktivitäten gegenüber der Kontrollgruppe, teils mit nominalem, teils mit signifikantem Unterschied. Die Wirkung einer Arsenzulage im Futter auf die Aktivitäten der Hexokinase bzw. Glukokinase war unspezifisch.

In der Literatur wurden in verschiedenen *in vitro*-Untersuchungen negative Effekte durch hohe Konzentrationen an Arsen auf die mikrobielle Fermentation und auch eine Hemmung verschiedener Enzyme nachgewiesen. In der eigenen Arbeit wurden einige fördernde und hemmende Wirkungen von eher geringerem Ausmaß beobachtet. Eine Arsenkonzentration in der hier eingesetzten Höhe führte folglich nicht zu eindeutigen Effekten. Eine schlechte Verfügbarkeit aus der Erde wäre zusätzlich denkbar. Die Kontamination der Grassilage mit Arsentrioxid im Versuch zur Gasbildung war daneben um den Faktor 10 geringer als geplant. Denkbar ist auch, dass die Mikroben Toleranzmechanismen entwickelten und somit das Arsen kaum schädigende Auswirkungen hatte. Eine Anregung von Enzymen durch Arsen scheint zwar recht widersprüchlich, wurde jedoch in der Literatur vereinzelt beschrieben und auf das Prinzip der „Arndt-Schulz`schen Regel“ zurückgeführt. Die erhöhte Konzentration von Arsen im Serum der Lämmer der Arsengruppe zum Zeitpunkt der Geburt kann zum einen Teil auf den erhöhten Arsengehalt im Kolostrum und zum anderen Teil möglicherweise auf eine transplazentare Übertragung von Arsen zurückgeführt werden. Die Auswirkungen einer natürlichen Arsenkontamination, in deren Anlehnung die Supplementierung der Futtermittel in der vorliegenden Arbeit erfolgte, scheint eher gering auszufallen. Ein gemäßiger Verzehr von tierischen Produkten aus arsenbelasteten Regionen sollte daher für den Konsumenten keine Gefahr darstellen.

Summary

In the past geogenic and anthropogenic causes lead to great arsenic contaminations of soil in some regions of the Free State of Saxony. Rivers and floodings still to this day cause a wide-ranging distribution of soil particles, which results in arsenic contamination of grasslands. Especially soil particles, adherenced to plants, often cause an excess of the threshold for arsenic in forage in these areas. Mainly for ruminants a risk of an uptake of arsenic with the forage exists.

In this work the influence of arsenic on the degradation of crude nutrients, ruminal microbial activity and protein synthesis was investigated. In trials with sheep insights on excretion and accumulation of arsenic should be gained. Possible influences on enzymatic activity and hematological parameters were also assayed. Additionally, on the basis of the obtained results, the risk of introducing arsenic into the food chain of humans was estimated.

In an *in vitro* trial the gas production by using a grass silage with different proportions of concentrate (0, 20 and 30 %) and with addition of soil with normal or high arsenic content was studied (max. 0.8 or 11 to 12 mg As/kg dry matter (DM) in the feed variants, respectively). In another study, the synthetic compounds arsenic trioxide and sodium arsenate heptahydrate (sodium arsenate) were applied in dosages of 0, 2, 5, 10, 20 und 50 mg arsenic/kg DM to a grass silage. Arsenic trioxide is considered to be more toxic than sodium arsenate. The cumulative volume of produced gas was plotted against the time and evaluated by regression analysis. The addition of arsenic contaminated soil did not influence the potential of gas production. The maximum rate of the gas production and its term (inflection point) hardly varied in comparison with the variants containing soil with a normal content of arsenic. Only when the concentrate proportion was 30 % the addition of arsenic contaminated soil caused a higher maximum rate of gas formation and the inflection point of the curve was reached 1.1 h earlier.

Due to the supplementation of the synthetic arsenic compounds, only in 2 treatments with arsenic a higher potential of gas production, compared to the variant without arsenic, was detected. However, in all treatments the maximum gas production was similar. Merely in the sodium arsenate variant with 50 mg arsenic/kg DM it was on a lower level. The time needed to reach the inflection point increased with the amount of added arsenic trioxide or sodium arsenate. When 50 mg arsenic/kg DM as sodium arsenate were added the inflection point was achieved first.

To measure the degradation of crude nutrients and the microbial protein synthesis *in vitro* a rumen simulation technique was used. Either arsenic as arsenic trioxide or sodium arsenate (0, 5, 20 mg arsenic/kg DM) were incubated with rumen fluid together with grass silage. Indeed, there were differences in the degradation of crude nutrients between the treatments with supplemented arsenic, but in comparison with the treatment without arsenic no differences were observed. The amino acid pattern of the microbial protein and the efficiency of the protein synthesis were not affected.

Digestibility studies were conducted using wethers to test an influence of ingested arsenic on crude nutrients and the excretion of arsenic. Therefore an arsenic containing soil or arsenic trioxide contaminated concentrate (15 to 17 mg and 18.3 arsenic/kg DM in the ration, respectively) were used. The addition of soil to grass silage resulted in a significantly lower degradation of crude fibre. When fresh grass or hay were used the soil caused a significantly lower degradation of crude protein. The mean daily excretion of the whole excreted arsenic in the arsenic group was 67 and 33 % with feces and urine, respectively. The difference between ingested and excreted arsenic could not be calculated accurately. The uptake of arsenic trioxide enriched concentrate in a ration that contained hay, grass silage and straw resulted in a significantly higher degradation of crude fibre. Arsenic was excreted with an average of 81 % with feces and about 19 % with urine. The differences between ingested and excreted arsenic were small. Within 6 days after the end of the digestibility trial the arsenic concentration in the feces decreased from 43 mg to < 1 mg arsenic/kg DM on average.

In a study using pregnant ewes an arsenic containing concentrate was fed (15 to 20 mg arsenic/kg DM in the ration) for 5 month. A concentrate without arsenic supplementation was fed to a control group. 4-weekly blood/serum, horn (claw) and wool were sampled, at birth colostrum milk and the placenta and milk 2-weekly following the date of birth. Furthermore at slaughter the kidney, liver and muscle were sampled. Within the ewes slaughters were conducted at the beginning of the trial, at the time of birth, and 4 weeks after it. Also at the time of birth and 4 and 8 weeks later 3 lambs per group were slaughtered. After a 4-weekly suckling period lambs were fed a concentrate according to their group, or the concentrate of the other group. The uptake of arsenic did not influence blood parameters hemoglobin, erythrocytes, and hematocrit of the ewes. The amount of leukocytes in the arsenic group was consistently on a higher level. The arsenic concentration in the serum of ewes and lambs of the arsenic group was higher than in the control group. In both groups the arsenic content in the colostrum milk was higher than in

ripe milk, whose arsenic concentration was lower than 8 µg arsenic/l in both groups (but with differences between the groups). Wool and horn had highest concentrations (3 to 4 mg arsenic/kg DM in ewes and lambs). 8 weeks after birth the arsenic concentration in the organs were 1, 0.5 and 0.4 mg arsenic/kg DM in kidney, liver and muscle of the ewes, respectively. At the time of birth and 4 weeks later, no arsenic in the organs of any lamb was detected. Only after the uptake of arsenic-enriched concentrate over 4 weeks arsenic concentrations at nearly the same level as in ewes were detected. In the placentas the mean arsenic concentration was 2.6 mg arsenic/kg DM. The uptake of arsenic containing concentrate caused repeatedly higher activities of the pyruvate kinase in ewes as well as in lambs at the age of 4 and 8 weeks, partly with significant and partly with nominal differences, in comparison to the control group. The effect of the supplementation of arsenic on the activity of the hexokinase and glucokinase was nondirectional.

In the literature in several *in vitro* studies negative effects of high concentrations of arsenic on the microbial fermentation were described, as well as the inhibition of enzyme activities. In the own work only some small promotional as well as inhibiting effects were observed. The level of the arsenic concentration used in this work did not result in clear effects. A low availability of arsenic from the soil could be possible, too. Apart from this, the contamination of the grass silage with arsenic trioxide in the gas formation trial was 10-fold lower than it was planned. The development of microbial tolerance mechanisms as a protection against damages by arsenic is possible, too. A stimulation of enzymes by arsenic seems contradictorily, but was occasionally described in the literature with the “Arndt-Schulz`sche Regel”. The higher concentration of arsenic in the serum of newborn lambs of the arsenic group was caused on the one hand by the high arsenic content of the colostrum milk and on the other hand possibly by a transplacental carry over of arsenic. The effects of a natural arsenic contamination, which was the base for the supplementation of the feed in this study, seemed to be rather low. A moderate consumption of animal products from regions with arsenic contaminated soils does probably not cause a risk for the consumer.

Literaturverzeichnis

- ABE, M., H. SHIBUI, T. ITIKI & F. KUMENO, Relation between diet and protozoal population in the rumen. *British Journal of Nutrition*, 1973. 29(2): 197-202.
- ABERNATHY, C.O., Y.P. LIU, D. LONGFELLOW, H.V. APOSHIAN, B. BECK, B. FOWLER, R. GOYER, R. MENZER, T. ROSSMAN, C. THOMPSON & M. WAALKES, Arsenic: Health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environmental Health Perspectives*, 1999. 107(7): 593-597.
- ABRAHAMS, P.W. & J. STEIGMAJER, Soil ingestion by sheep grazing the metal enriched floodplain soils of Mid-Wales. *Environmental Geochemistry and Health*, 2003. 25(1): 17-24.
- ACHILLES, W., Anatomie für die Tiermedizin. Enke Ferdinand, 2008. 884 Seiten, ISBN 3830410751.
- AfBN, Leitlinien für die Bestimmung der Verdaulichkeit von Roh Nährstoffen an Wiederkäuern. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 1991. 65: 229-234.
- AHMANN, D., A.L. ROBERTS, L.R. KRUMHOLZ & F.M.M. MOREL, Microbe grows by reducing arsenic. *Nature*, 1994. 371(6500): 750.
- ALONSO, M.L., J. L. BENEDITO, M. MIRANDA, C. CASTILLO, J. HERNÁNDEZ & R.F. SHORE, Arsenic, cadmium, lead, copper and zinc in cattle from Galicia, NW Spain. *The Science of The Total Environment*, 2000. 246(2-3): 237-248.
- ALONSO, M.L., J. L. BENEDITO, M. MIRANDA, C. CASTILLO, J. HERNÁNDEZ & R.F. SHORE, Interactions between toxic and essential trace metals in cattle from a region with low levels of pollution. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2002. 42(2): 165-172.
- ANKE, M., R. MÜLLER & U. SCHÄFER, Recent progress in exploring the essentiality of the non-metallic ultratrace element arsenic to the nutrition of animals and man. *Biomedical Research on Trace Elements*, 2005. 16(3): 188-197.
- ANTUNOVIĆ, Z., I. BOGUT, D. SENCIC, M. KATIC & P. MIJIC, Concentrations of selected toxic elements (cadmium, lead, mercury and arsenic) in ewe milk in dependence on lactation stage. *Czech Journal of Animal Science*, 2005. 50(8): 369-375.
- APOSHIAN, H.V., Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to Arsenic Toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1997. 37: 397-419.

- ASCHENBACH, J.R., S.K. BHATIA, H. PFANNKUCHE & G. GABEL, Glucose is absorbed in a sodium-dependent manner from forestomach contents of sheep. *Journal of Nutrition*, 2000. 130(11): 2797-2801.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), Case studies in environmental medicine, Arsenic toxicity. Atlanta, 2000.
<http://www.atsdr.cdc.gov/csem/arsenic/index.html> (04.2009)
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), Toxicological profile for arsenic. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2007.
<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.pdf> (03.2009)
- AYAR, A., D. SERT & N. AKIN, The trace metal levels in milk and dairy products consumed in middle Anatolia – Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2009. 151: 1-12.
- BANAFSCHEH, A., DMPS und Dimercaprol in der Therapie der akuten Arsenintoxikation. Dissertation, 2004.
- BARRON, E.S.G. & T.P. SINGER, Studies on biological oxidations. XIX. Sulfhydryl enzymes in carbohydrate metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 1945. 157(1): 221-240.
- BASSETT, J.M., Endocrine factors in the control of nutrient utilization: ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*, 1978. 37: 273-280.
- BASSLER, R., VDLUFA-Methodenbuch, Vol. VII. Umweltanalytik. 5. Ergänzung, VDLUFA-Verlag Darmstadt, 2007.
- BASSLER, R., VDLUFA-Methodenbuch, Vol. VIII, Umweltanalytik. 2. Auflage, VDLUFA-Verlag Darmstadt, 2003.
- BBodSchG (Gesetz zum Schutz vor schädlichen Bodenveränderungen und zur Sanierung von Altlasten, Bundes-Bodenschutzgesetz) vom 17. März 1998 (BGBl. I S. 502), zuletzt geändert durch Artikel 3 des Gesetzes vom 9. Dezember 2004 (BGBl. I S. 3214).
- BBodSchV (Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung) vom 12. Juli 1999 (BGBl. I S. 1554), geändert durch Artikel 2 der Verordnung vom 23. Dezember 2004 (BGBl. I S. 3758), Maßnahmenwerte nach § 8 Abs. 1 Satz 2 Nr. 2 des Bundes-Bodenschutzgesetzes.

- BELL, D.A., J.A. TAYLOR, D.F. PAULSON, C.N. ROBERTSON, J.L. MOHLER & G.W. LUCIER, Genetic risk and carcinogen exposure - a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione-S-transferase M1 (GstM1) that increases susceptibility to bladder-cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 1993. 85(14): 1159-1164.
- BENNETT, B.G., Exposure of man to environmental arsenic - an exposure commitment assessment. *Science of the Total Environment*, 1981. 20(2): 99-107.
- BERESFORD, N.A., N.M.J. CROUT & R.W. MAYES, The transfer of arsenic to sheep tissues. *Journal of Agricultural Science*, 2001. 136: 331-344.
- BERGMAN, E.N., Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*, 1990. 70(2): 567-590.
- BEUVINK, J.M. & J. KOGUT, Modeling gas production kinetics of grass silages incubated with buffered ruminal fluid. *Journal of Animal Science*, 1993. 71(4): 1041-1046.
- BgVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin), Richtwerte für Schadstoffe in Lebensmitteln werden vom BgVV zurückgezogen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 2000. 43: 1020.
- BHATTACHARYA, P., A.H. WELCH, K.G. STOLLENWERK, M.J. MCLAUGHLIN, J. BUNDSCHUH & G. PANALLAH, Arsenic in the environment: biology and chemistry. *Science of the Total Environment*, 2007. 379(2-3): 109-120.
- BIRD, H.R., A.C. GROSCHE & M. RUBIN, Effect of arsonic acid derivatives in stimulating growth of chicks fed certain diets. *Federation Proceedings*, 1948. 7(1): 283-283.
- BISSEN, M. & F.H. FRIMMEL, Arsenic - a review. - Part 1: Occurrence, toxicity, speciation, mobility. *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica*, 2003. 31(1): 9-18.
- BLOCK, R.J., D. BOLLING, F.C. BRAND & A. SCHEIN, The composition of keratins. The amino acid composition of hair, wool, horn, and other euceratins. *Journal of Biological Chemistry*, 1939. 128(1): 181-186.
- BOGUHN, J., R. KRÜGER, O. STEINHÖFEL, R. KLOSE & M. RODEHUTSCORD, Arsenic transfer from exposed pasture into sheep. *Verhalten von Arsen in geologischen, hydrologischen und biologischen Systemen, Arsen-Workshop in Leipzig, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung UFZ*, 2007.
- BOMBACH, G., A. PIERRA & W. KLEMM, Arsenic in contaminated soil and river sediment. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 1994. 350(1-2): 49-53.

- BORYS, M., T. PAKULSKI, B. BORYS, E. PAKULSKA & E. WEGRZYN, The content and retention of some major and trace minerals in sheep's milk and cheese. *Archiv Tierzucht, Dummerstorf*, 2006. 49(Special Issue): 263-267.
- BOWELL, R.J., Sorption of arsenic by iron-oxides and oxyhydroxides in soils. *Applied Geochemistry*, 1994. 9(3): 279-286.
- BRADFORD, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976. 72(1-2): 248-254.
- BRANDT, M. & K. ROHR, Beiträge zur Quantifizierung der N-Umsetzungen in den Vormägen von Milchkühen. *Zeitschrift für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde*, 1981. 46: 39-48.
- BRUINS, M.R., S. KAPIL & F.W. OEHME, Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2000. 45(3): 198-207.
- BUCY, L.L., U.S. GARRIGUS, R.M. FORBES, H.W. NORTON & M.F. JAMES, Arsenical supplements in lamb fattening rations. *Journal of Animal Science*, 1954. 13(3): 668-676.
- BUCY, L.L., U.S. GARRIGUS, R.M. FORBES, H.W. NORTON & W.W. Moore, Toxicity of some arsenicals fed to growing-fattening lambs. *Journal of Animal Science*, 1955. 14(2): 435-445.
- BURTON, G.A., A. DROTAR, J.M. LAZORCHAK & L.L. BAHLs, Relationship of microbial activity and *Ceriodaphnia* responses to mining impacts on the Clark Fork River, Montana. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1987. 16(5): 523-530.
- BURTON, G.A. & G.R. LANZA, Sediment microbial activity tests for the detection of toxicant impacts. In: Cardwell, R.D., R. Purdy, R.C. Bahner, ASTM Committee E-47 on Biological Effects and Environmental Fate, *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Seventh Symposium*. ASTM International, 1985. 587 Seiten, ISBN 0803104103.
- CALVERT, C.C. & L.W. SMITH, Arsenic in tissues of sheep and milk of dairy-cows fed arsanilic acid and 3-nitro-4-hydroxyphenylarsonic acid. *Journal of Animal Science*, 1980. 51(2): 414-421.
- CARBONELL-BARRACHINA, A., F. BURLO-CARBONELL & J. MATAIX-BENEYTO, Arsenic uptake, distribution, and accumulation in tomato plants: effect of arsenite on plant growth and yield. *Journal of Plant Nutrition*, 1995. 18(6): 1237-1250.

- CARLIN, A., W.P. SHI, S.DEY & B.P. ROSEN, The ars operon of *Escherichia Coli* confers arsenical and antimonial resistance. *Journal of Bacteriology*, 1995. 177(4): 981-986.
- CARPENTER, L.W., The effect of 3-nitro-4-hydroxy phenyl arsonic acid on the growth of swine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1951. 32(1): 181-186.
- CASE, A.A., Toxicity of various chemical agents to sheep. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1974. 164: 277-283.
- CHAPMAN, C., On the presence of compounds of arsenic in marine crustaceans and shell fish. *The Analyst*, 1926. 51(608): 548-563.
- CHAPPELL W., C.O. ABERNATHY & R.L. CALDERON, Arsenic exposure and health effects: Proceedings of the Third International Conference on Arsenic Exposure and Health Effects, July 12-15, 1998, San Diego, California. Elsevier, 1999. 440 Seiten, ISBN 008043648X.
- CHEN, M.L., R.S. KING & H.J. ARMBRECHT, Sodium-dependent phosphate transport in primary cultures of renal tubule cells from young and adult rats. *Journal of Cellular Physiology*, 1990. 143(3): 488-493.
- CHIOU, H., Y. HSUEH, L. HSIEH, L. HSU, Y. HSU, F. HSIEH, M. WEI, H. CHEN, H. YANG, L. LEU, T. CHU, W. CHEN, M. YANG & C. CHEN, Arsenic methylation capacity, body retention, and null genotypes of glutathione S-transferase M1 and T1 among current arsenic-exposed residents in Taiwan. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research Arsenic: A Paradoxical Human Carcinogen*, 1997. 386(3): 197-207.
- CHIOU, P.W.S., K.L. CHEN & B. YU, Effects of roxarsone on performance, toxicity, tissue accumulation and residue of eggs and excreta in laying hens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1997. 74(2): 229-236.
- CLELAND, W.W., Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry*, 1964. 3(4): 480-482.
- CRECELIUS, E.A., Changes in chemical speciation of arsenic following ingestion by man. *Environmental Health Perspectives*, 1977. 19(Aug): 147-150.
- CROSS, J.D., I.M. DALE, A.C.D. LESLIE & H. SMITH, Industrial exposure to arsenic. *Journal of Radioanalytical Chemistry*, 1979. 48(1-2): 197-208.
- CULLEN, W.R., Is Arsenic an aphrodisiac?: The sociochemistry of an element. Royal Society of Chemistry (Great Britain), 2008. 412 Seiten, ISBN 0854043632.
- CULLEN, W.R. & K.J. REIMER, Arsenic speciation in the environment. *Chemical Reviews*, 1989. 89(4): 713-764.

- CZERKAWSKI, J.W. & G. BRECKENRIDGE, Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition*, 1977. 38: 371-384.
- DANG, H.S., D.D. JAISWAL & S. SOMASUNDARAM, Distribution of arsenic in human tissues and milk. *The Science of The Total Environment*, 1983. 29(1-2): 171-175.
- DEMBITSKY, V.M. & D.O. LEVITSKY, Arsenolipids. *Progress in Lipid Research*, 2004. 43(5): 403-448.
- DONOHUE, J.M & C.O. ABERNATHY, Exposure to inorganic arsenic from fish and shellfish. In: Chappell, W.R., C.O. Abernathy & R.L. Calderon, *Arsenic Exposure and Health Effects. Proceedings of the Third International Conference on Arsenic Exposure and Health Effects*, July 12-15, 1998, San Diego, California. Elsevier, 1999. 440 Seiten, ISBN 008043648X.
- DVGW (Deutsche Vereinigung des Gas- und Wasserfaches e.V.), *Verordnung zur Novellierung der Trinkwasserverordnung vom 21. Mai 2001*.
- EDMONDS, J.S. & K.A. FRANCESCONI, Arsenic metabolism in aquatic ecosystems. In: Langston, W.J. & M.J. Bebianno, *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Springer, 1998. 448 Seiten, ISBN 0412803704.
- European Commission, Health and Consumers Directorate-General, *Summary record of the standing committee on the food chain and animal health held on 28 April 2009 in Brussels (Section Animal Nutrition)*, 2009.
- FELDMANN, J., K. JOHN & P. PENGPRECHA, Arsenic metabolism in seaweed-eating sheep from Northern Scotland. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 2000. 368(1): 116-121.
- FELL, D.A., P.F. LIDDLE, A.R. PEACOCKE & R.A. DWEK, The preparation and properties of pyruvate kinase from yeast. *The Biochemical Journal*, 1974. 139(3): 665-675.
- FERM, V.H., Arsenic as a teratogenic agent. *Environmental Health Perspectives*, 1977. 19(Aug): 215-217.
- FLACHOWSKY, G. (Herausgeber), *Möglichkeiten der Dekontamination von „Unerwünschten Stoffen nach Anlage 5 der Futtermittelverordnung (2006)“*. Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Sonderheft 294, *Landbauforschung Völkenrode FAL Agriculture Research*, 2006. 292 Seiten, ISBN 386576018.
- FLUHARTY, A. & D.R. SANADI, Evidence for a vicinal dithiol in oxidative phosphorylation. *Biochemistry*, 1960. 46(5): 608-616.
- FORSBERG, C.W., Some effects of arsenic on the rumen microflora – an *in vitro* study. *Canadian Journal of Microbiology*, 1978. 24(1): 36-44.

- FRANCESCONI, K.A. & D. KUEHNELT, Arsenic compounds in the environment. In: Frankenberger, W.T., Environmental Chemistry of Arsenic. CRC Press, 2002. 391 Seiten, ISBN 0824706765.
- FRANCESCONI, K., R. TANGGAARD, C.J. MCKENZIE & W. GOESSLER, Arsenic metabolites in human urine after ingestion of an arsenosugar. *Clinical Chemistry*, 2002a. 48(1): 92-101.
- FRANCESCONI, K., P. VISOOTTIVISETH, W. SRIDOKCHAN & W. GOESSLER, Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils. *Science of the Total Environment*, 2002b. 284(1-3): 27-35.
- FRIESE, K., B. WITTER & G. MIEHLICH, Auenforschung in Deutschland: Böden, Hydrologie, Schadstoffe. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung - Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie*, 2000. 12(6): 358-360.
- FutMV, Futtermittelverordnung, EG-Richtlinie 2002/32 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 7. Mai 2002 über unerwünschte Stoffe in der Tierernährung. Sechster Abschnitt: Unerwünschte Stoffe, Rückstände von Schädlingsbekämpfungsmitteln, verbotene Stoffe, § 23: Höchstgehalte an unerwünschten Stoffen; neugefasst durch B. v. 24.05.2007 BGBl. I S. 770; zuletzt geändert durch Artikel 2 V. v. 20.02.2009 BGBl. S. 400; Geltung ab 15.04.1981.
- GARBARINO, J.R., D.W. RUTHERFORD & R.L. WERSHAW, Degradation of roxarsone in poultry litter. *The proceedings of Arsenic in the Environment Workshop*, 2001.
- GEBEL, T.W., Genotoxicity of arsenical compounds. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2001. 203(3): 249-262.
- GELLER, W., K. OCKENFELD, M. BÖHME & A. KNÖCHEL, Schadstoffbelastung nach dem Elbe-Hochwasser 2002; Endbericht des Ad-hoc-Projekts 'Schadstoffuntersuchungen nach dem Hochwasser vom August 2002 – Ermittlung der Gefährdungspotentiale an Elbe und Mulde'. Endbericht; UFZ – Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Dept. Fließgewässerökologie, 2004.
- GfE, Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Milchkühe und Aufzuchtrinder. DLG Verlags GmbH, Frankfurt/Main, 2001.
- GOLDFRANK, L.R., N. FLOMENBAUM, M.A. HOWLAND, R.S. HOFFMAN, N.A. LEWIN & L.S. NELSON, *Goldfrank's Toxicologic Emergencies*. Edition 8, McGraw-Hill Professional, 2006. 1981 Seiten, ISBN 0071437630.

- GONZÁLEZ, M.J., M.V. AQUILAR & M.C. MARTINEZ, Gastrointestinal absorption of inorganic arsenic (V): The effect of concentration and interactions with phosphate and dichromate. *Veterinary and Human Toxicology*, 1995. 37(2):131-136.
- GONZÁLEZ, M.J., M.V. AQUILAR & M.C. MARTINEZ, Mechanisms of absorption of As₂O₅ from rat small intestine: the effect of different parameters. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology: Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 1997. 11(4): 239-47.
- GRANTHAM, D.A. & J.F. JONES, Arsenic contamination of water wells in Nova Scotia. *Journal of the American Water Works Association*, 1977. 69(12): 653-657.
- GRESSER, M., ADP-arsenate. Formation by submitochondrial particles under phosphorylating conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 1981. 256(12): 5981-5983.
- GRIFFITHS, M., Inhibition of enzymatic transphosphorylation by alloxan and ninhydrin in tissue extracts. *Archives of Biochemistry*, 1949. 20(2): 451-456. Zitiert in: Bruns, F., Hemmung der Xanthinoxidase durch Isatin, Ninhydrin und Alloxan. *Die Naturwissenschaften*, 1954. 41(15): 360.
- GULZ, P.A., S.K. GUPTA & R. SCHULIN, Arsenic accumulation of common plants from contaminated soils. *Plant and Soil*, 2005. 272(1-2): 337-347.
- HADJIPANAYIOTOU, M., Composition of ewe, goat and cow milk and of colostrum of ewes and goats. *Small Ruminant Research*, 1995. 18(3): 255-262.
- HAMER, D.H., Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry*, 1986. 55: 913-951.
- HANSEN, H.R., A. RAAB, K.A. FRANCESCONI & J. FELDMANN, Metabolism of arsenic by sheep chronically exposed to arsenosugars as a normal part of their diet. 1. Quantitative intake, uptake, and excretion. *Environmental Science & Technology*, 2003. 37(5): 845-851.
- HASSAUER, M. & F. KALBERLAH, Arsen und Verbindungen. In: Eikmann, T., Heinrich, U., Heinzow, B., Konietzka, R., Gefährdungsabschätzung von Umweltschadstoffen, Ergänzbare Handbuch toxikologischer Basisdaten und ihre Bewertung. Grundwerk, Kennziffer D 095. Erich Schmidt Verlag, Berlin, 1999. 2466 Seiten, ISBN 9783503050833.
- HÄBLER, S. & R. KLOSE, Arsentransfer Boden – Pflanze. Schriftenreihe der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft, 2006.
- HERBEL, M.J., J.S. BLUM, S.E. HOEFT, S.M. COHEN, L.L. ARNOLD, J. LISAK, J.F. STOLZ & R. S. OREMLAND, Dissimilatory arsenate reductase activity and arsenate-respiring

- bacteria in bovine rumen fluid, hamster feces, and the termite hindgut. *Fems Microbiology Ecology*, 2002. 41(1): 59-67.
- HERING, J.E. & P.E. KNEEBONE, On arsenic occurrence and mobility in water supplies. In: Frankenberger, W.T., *Environmental Chemistry of Arsenic*. CRC Press, 2002. 391 Seiten, ISBN 0824706765.
- HINDMARSH, J.T., Arsenic, its clinical and environmental significance. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 2000. 13(1): 165-172.
- HOOVER, W.H., Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *Journal of Dairy Science*, 1986. 69(10): 2755-2766.
- HORN, M. & H. ERDMANN, Zu einem häufig begangenen Fehler beim statistischen Vergleich von Populationen mit Hilfe von Vertrauensintervallen. *Zeitschrift für Versuchstierkunde*, 1978. 20: 229-232.
- HU, Y., L. SU & E.T. SNOW, Arsenic toxicity is enzyme specific and its effects on ligation are not caused by the direct inhibition of DNA repair enzymes. *Mutation Research-DNA Repair*, 1998. 408(3): 203-218.
- HUANG, R.N. & T.C. LEE, Cellular uptake of trivalent arsenite and pentavalent arsenate in KB cells cultured in phosphate-free medium. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1996. 136(2): 243-249.
- HUTCHINSON, T.C., S. AUFREITER & R.G.V. HANCOCK, Arsenic pollution in the Yellowknife area from gold smelter activities. *Journal of Radioanalytical Chemistry*, 1982. 71(1-2): 59-73.
- ISHIGURO, S., Industries using arsenic and arsenic compounds. *Applied Organometallic Chemistry*, 1992. 6(4): 323-331.
- IYNEDJIAN, P., A. GJINOVCI & A. RENOLD, Stimulation by insulin of glucokinase gene transcription in liver of diabetic rats. *Journal of Biological Chemistry*, 1988. 263(2): 740-744.
- JACKSON, C.R. & S.L. DUGAS, Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal *arsC* gene sequences suggests an ancient, common origin for arsenate reductase. *BMC Evolutionary Biology*, 2003. 3: 18-27.
- JANDER, R., J. RAUTERBERG, B. VOSS & D.B. VON BASSEWITZ, A cysteine-rich collagenous protein from bovine placenta - Isolation of its constituent polypeptide-chains and some properties of the non-denatured protein. *European Journal of Biochemistry*, 1981. 114(1): 17-25.

- JANSSEN, P.H. & M. KIRS, Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied Environmental Microbiology*, 2008. 74(12): 3619-3625.
- JASPER, M., Untersuchungen zum Einfluss von Sulfat auf den Thiamin- und Thiaminderivatgehalt im bovinen Pansensaft (*in vitro*). Inaugural-Dissertation; Tierärztliche Hochschule Hannover, 2000.
- JELINEK, P., S. GAJDUŠEK & J. ILLEK, Variations of mineral content in sheep milk during lactation. *Živočišná Výroba*, 1993. 38: 85–96. Zitiert in: Antunović, Z., I. Bogut, D. Sencic, M. Katic & P. Mijic, Concentrations of selected toxic elements (cadmium, lead, mercury and arsenic) in ewe milk in dependence on lactation stage. *Czech Journal of Animal Science*, 2005. 50(8): 369-375.
- JONES, F.T., A broad view of arsenic. *Poultry Science*, 2007. 86(1): 2-14.
- JUILLOT, F., P. ILDEFONSE, G. MORIN, G. CALAS, A.M. DE KERSABIEC & M. BENEDETTI, Remobilization of arsenic from buried wastes at an industrial site: mineralogical and geochemical control. *Applied Geochemistry*, 1999. 14(8): 1031-1048.
- KABATA-PENDIAS, A. & PENDIAS, H., Trace Elements in Soils and Plants. Edition: 3, CRC Press, 2000. 413 Seiten, ISBN 0849315751.
- KEEGAN, T.J., M.E. FARAGO, I. THORNTON, B. HONG, R.N. COLVILE, B. PESCH, P. JAKUBIS & M.J. NIEUWENHUIJSEN, Dispersion of As and selected heavy metals around a coal-burning power station in central Slovakia. *Science of The Total Environment*, 2006. 358(1-3): 61-71.
- KENNEY, L.J. & J.H. KAPLAN, Arsenate substitutes for phosphate in the human red cell sodium pump and anion exchanger. *Journal of Biological Chemistry*, 1988. 263(17): 7954-7960.
- KLEBER, H.P., D. SCHLEE & W. SCHÖPP, *Biochemisches Praktikum*. Fischer Verlag, 1988. 263 Seiten, ISBN 3334000842.
- KRAFFT, T. & J.M. MACY, Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. *European Journal of Biochemistry*, 1998. 255(3): 647-653.
- KREPPPEL, H., J.W. BAUMAN, J. LIU, J.M. MCKIM JR. & C.D. KLAASSEN, Induction of metallothionein by arsenicals in mice. *Toxicology Sciences*, 1993. 20(2): 184-189.
- KUROIWA, T., A. OHKI, K. NAKA & S. MAEDA, Biomethylation and biotransformation of arsenic in a freshwater food chain: Green alga (*Chlorella vulgaris*) → shrimp (*Neocaridina denticulata*) → killifish (*Oryzias latipes*). *Applied Organometallic Chemistry*, 1994. 8(4): 325-333.

- LAVERMAN, A., J.S. BLUM, J.K. SCHAEFER, E.J.P. PHILLIPS, D.R. LOVLEY & R.S. OREMLAND, Growth of strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors. *Applied Environmental Microbiology*, 1995. 61(10): 3556-3561.
- LAWRENCE, J.F., P. MICHALIK, G. TAM & H.B.S. CONACHER, Identification of arsenobetaine and arsenocholine in Canadian fish and shellfish by high-performance liquid-chromatography with atomic-absorption detection and confirmation by fast-atom-bombardment mass-spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1986. 34(2): 315-319.
- LAZARUS, N.R., M. DERECHIN & E.A. BARNARD, Yeast hexokinase. III. Sulfhydryl groups and protein dissociation. *Biochemistry*, 1968. 7(6): 2390-2400.
- LEE C., N.B. KIM & I.C. LEE, Study on the concentration of some trace elements. *Journal of the Korean Nuclear Society*, 1976. 8(4): 195-201.
- LEE, J.J., Y. K. KIM, S.H. CHO, K.S. PARK, L.J. CHUNG, D. CHO, D.W. RYANG & H.J. KIM, Hemolytic anemia as a sequela of arsenic intoxication following long-term ingestion of traditional Chinese medicine. *Journal of Korean Medical Science*, 2004. 19(1): 127-129.
- LESCHINE, S., Degradation of polymers: cellulose, xylan, pectin, starch. In: Dürre, P., *Handbook on Clostridia*. CRC Press, 2005. 903 Seiten, ISBN 0849316189.
- LfL, Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft, Hinweise und Empfehlungen zum Umgang mit arsen- und schwermetallbelasteten landwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden. Faltblatt 84, 2006.
- LfUG, Sächsisches Landesamt für Umwelt und Geologie, Landesentwicklungsplan Sachsen, Sächsisches Staatsministerium des Innern, Anhang 3: Fachplanerische Inhalte des Landschaftsprogramms, 2003.
- LIEBL, B., H. MÜCKTER, E. DOKLEA, B. FICHTL & W. FORTH, Influence of organic and inorganic arsenicals on glucose uptake in Madin–Darby canine kidney (MDCK) cells. *The Analyst*, 1992. 117: 681-684.
- LIU, Z., J.M. CARBREY, P. AGRE & B.P. ROSEN, Arsenic trioxide uptake by human and rat aquaglyceroporins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004. 316(4): 1178-1185.
- LÜLLMANN-RAUCH, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag, 2006. 637 Seiten, ISBN 3131292423.

- LUSHCHAK, V.I., T.V. BAGNYUKOVA, J.M. STOREY & K.B. STOREY, Influence of exercise on the activity and the distribution between free and bound forms of glycolytic and associated enzymes in tissues of horse mackerel. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2001. 34(8): 1055-1064.
- MA, L.Q., K.M. KOMAR, C. TU, W.H. ZHANG, Y. CAI & E.D. KENNELLEY, A fern that hyperaccumulates arsenic - a hardy, versatile, fast-growing plant helps to remove arsenic from contaminated soils. *Nature*, 2001. 409(6820): 579-579.
- MACHLIS, L., Accumulation of arsenic in the shoots of Sudan Grass and Bush Bean. *Plant Physiology*, 1941. 16(3): 521-544.
- MACKINNON, P.J., B.C. POWELL & G.E. ROGERS, Structure and expression of genes for a class of cysteine-rich proteins of the cuticle layers of differentiating wool and hair-follicles. *Journal of Cell Biology*, 1990. 111(6): 2587-2600.
- MACNAIR, M.R. & Q. CUMBES, Evidence that arsenic tolerance in *Holcus Lanatus L.* is caused by an altered phosphate-uptake system. *New Phytologist*, 1987. 107(2): 387-394.
- MACUR, R.E., C.R. JACKSON, L.M. BOTERO, T.R. MCDERMOTT & W.P. INSKEEP, Bacterial populations associated with the oxidation and reduction of arsenic in an unsaturated soil. *Environmental Science & Technology*, 2004. 38(1): 104-111.
- MADIGAN, M.T., J.M. MARTINKO & T.D. BROCK, *Brock Mikrobiologie*. 11. überarbeitete Auflage, Pearson Studium, 2006. 1240 Seiten, ISBN 3827371872.
- MAEDA, S., A. OHKI, K. KUSADOME, T. KUROIWA, I. YOSHIFUKU & K., NAKA, Bioaccumulation of arsenic and its fate in a freshwater food chain. *Applied Organometallic Chemistry*, 1992. 6(2): 213-219.
- MAHIMAIRAJA, S., N.S. BOLAN, D.C. ADRIANO & B. ROBINSON, Arsenic contamination and its risk management in complex environmental settings. *Advances in Agronomy*, 2005. 86: 1-82.
- MARQUARDT, H. & S.G. SCHÄFER, *Lehrbuch der Toxikologie, Sonderausgabe*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1997. 1004 Seiten, ISBN 3804716881.
- MARTIUS, F., *Das Arndt-Schulz'sche Grundgesetz*, Münchener Medizinische Wochenschrift, 1923. 70: 1005.
- MASSCHELEYN, P.H., R.D. DELAUNE & W.H. PATRICK, Effect of redox potential and ph on arsenic speciation and solubility in a contaminated soil. *Environmental Science & Technology*, 1991. 25(8): 1414-1419.

- MATSCHULLAT, J., Arsenic in the geosphere - a review. *The Science of The Total Environment*, 2000. 249(1-3): 297-312.
- MCDUGALL, E.I., Studies on Ruminant Saliva .1. The composition and output of sheeps saliva. *The Biochemical Journal*, 1948. 43(1): 99-109.
- MCDOWELL, G.H., Hormonal control of glucose homoeostasis in ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*, 1983. 42(2): 149-167.
- MCKINNEY, J.D., Metabolism and disposition of inorganic arsenic in laboratory-animals and humans. *Environmental Geochemistry and Health*, 1992. 14(2): 43-48.
- MEHARG, A.A. & M.R. MACNAIR, Suppression of the high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus L.* *Journal of Experimental Botany*, 1992. 43(4): 519-524.
- MEHARG, A.A. & J. HARTLEY-WHITAKER, Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist*, 2002. 154(1): 29-43.
- MEHARG, A.A. & L. JARDINE, Arsenite transport into paddy rice (*Oryza sativa*) roots. *New Phytologist*, 2003. 157(1): 39-44.
- MENKE, K., L. RAAB, A. SALEWSKI, H. STEINGASS, D. FRITZ & W. SCHNEIDER, The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *The Journal of agricultural science*, 1979. 93: 217-222.
- MIRANDA, M., M. L. ALONSO, C. CASTILLO, J. HERNANDEZ & J. L. BENEDITO, Effect of sex on arsenic, cadmium, lead, copper and zinc accumulation in calves. *Veterinary and Human Toxicology*, 2000. 42(5): 265-268.
- MOORE, S., D. MOENNICH & M. GRESSER, Synthesis and hydrolysis of ADP-arsenate by beef heart submitochondrial particles. *Journal of Biological Chemistry*, 1983. 258(10): 6266-6271.
- MOORE, J.N., W.H. FICKLIN & C. JOHNS, Partitioning of arsenic and metals in reducing sulfidic sediments. *Environmental Science & Technology*, 1988. 22(4): 432-437.
- MOREHOUSE, N.F. & O.J. MAYFIELD, The effect of some aryl arsonic acids on experimental coccidiosis infection in chickens. *The Journal of Parasitology*, 1946. 32(1): 20-24. Zitiert in: Bird, H.R., A.C. Groschke & M. Rubin, Effect of arsonic acid derivatives in stimulating growth of chicks fed certain diets. *Federation Proceedings*, 1948. 7(1): 283-283.
- MORRISON, J.L., Distribution of arsenic from poultry litter in broiler chickens, soil, and crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1969. 17(6): 1288-1290.

- MÜCKTER, H., Arsen. In: Biesalski, H.K., J. Köhrle, & K. Schümann, Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe – Prävention und Therapie mit Mikronährstoffen. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 2002. 774 Seiten, ISBN 3131293713.
- MUIRHEAD, H., D. A. CLAYDEN, D. BARFORD, C. G. LORIMER, L. A. FOTHERGILL-GILMORE, E. SCHILTZ & W. SCHMITT, The structure of cat muscle pyruvate kinase. *Embo Journal*, 1986. 5(3): 475-481.
- MUKHERJEE, A.B. & P. BHATTACHARYA, Arsenic in groundwater in the Bengal Delta Plain: slow poisoning in Bangladesh. *Environmental Reviews*, 2001. 9(3): 189-220.
- MUKHOPADHYAY, R., B.P. ROSEN, L.T. PHUNG & S. SILVER, Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *Fems Microbiology Reviews*, 2002. 26(3): 311-325.
- MUNNICH, A., S. LYONNET, D. CHAUVET, E. VAN SCHAFTINGEN & A. KAHN, Differential effects of glucose and fructose on liver L-type pyruvate kinase gene expression *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, 1987. 262(35): 17065-17071.
- NANDI, D., R.C. PATRA & D. SWARUP, Arsenic residues in hair samples from cattle in some arsenic affected areas of west Bengal, India. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2005. 75(2): 251-256.
- NAS (National Academy of Sciences), Washington D.C., Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants - Arsenic. Committee on Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants, Division of Medical Sciences; Assembly of Life Sciences; National Research Council, 1977.
- NAUMANN, C. & R. BASSLER, VDLUFA-Methodenbuch, Vol. III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln mit Ergänzungen von 1983, 1988, 1993 und 1997. VDLUFA-Verlag, Darmstadt, 1976.
- NAUMANN, C. & R. BASSLER, 2. Ergänzungslieferung in VDLUFA-Methodenbuch, Vol. III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln, VDLUFA-Verlag, Darmstadt, 1988.
- NAUMANN, C., R. BASSLER, R. SEIBOLD & C. BARTH, VDLUFA-Methodenbuch, Vol. III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln, VDLUFA-Verlag, Darmstadt, 2004.
- NEWMAN, D.K., E.K. KENNEDY, J.D. COATES, D. AHMANN, D.J. ELLIS, D.R. LOVLEY & F.M.M. MOREL, Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum sp. nov.* *Archives of Microbiology*, 1997. 168(5): 380-388.
- NICKEL, R., A. SCHLUMMER & E. SEIFERLE, Eingeweide. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere 2. Georg Thieme Verlag, 2004. 482 Seiten, ISBN 3830441525.

- NICKSON, R.T., J.M. MCARTHUR, B. SHRESTHA, T.O. KYAW-MYINT & D. LOWRY, Arsenic and other drinking water quality issues, Muzaffargarh District, Pakistan. *Applied Geochemistry*, 2005. 20(1): 55-68.
- NIES, D.H. & S. SILVER, Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of Industrial Microbiology*, 1995. 14(2): 186-199.
- NORTH, D.W., Risk assessment for ingested inorganic arsenic - a review and status-report. *Environmental Geochemistry and Health*, 1992. 14(2): 59-62.
- NRC, National Research Council, Subcommittee on Mineral Toxicity in Animals, Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture and Renewable Resources, Commission on Natural Sources, Mineral Tolerance of Domestic Animals. National Academy of Sciences, Washington, D.C., 1980.
- OKADA, S., T. MISAKA, I. MATSUMOTO, H. WATANABE & K. ABE, Aquaporin-9 is expressed in a mucus-secreting goblet cell subset in the small intestine. *FEBS Letters*, 2003. 540(1-3): 157-162.
- OREMLAND, R.S., S.E. HOEFT, J.M. SANTINI, N. BANO, R.A. HOLLIBAUGH & J.T. HOLLIBAUGH, Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by a facultative, arsenite-oxidizing chemoautotroph, strain MLHE-1. *Applied Environmental Microbiology*, 2002. 68(10): 4795-4802.
- OTIENO, S., A.K. BHARGAVA, E.A. BARNARD & A.H. RAMEL, Yeast hexokinases. VIII. Essential thiols of yeast hexokinase. Alkylation by a substrate-like reagent. *Biochemistry*, 1975. 14(11): 2403-2410.
- OVERBY, L.R. & R.L. FREDRICKSON, Feed additives, metabolic stability of radioactive arsanilic acid in chickens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1963. 11(5): 378-381.
- PAL, S. & A.K. CHATTERJEE, Prospective protective role of melatonin against arsenic-induced metabolic toxicity in Wistar rats. *Toxicology*, 2005. 208(1): 25-33.
- PEOPLES, S.A., Arsenic toxicity in cattle. *Annals New York Academy of Sciences*, 1964. 644-649.
- PETRICK, J.S., F. AYALA-FIERRO, W.R. CULLEN, D.E. CARTER & H.V. APOSHIAN, Monomethylarsonous acid (MMAIII) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2000. 163(2): 203-207.
- PETRICK, J.S., B. JAGADISH, E.A. MASH & H. V. APOSHIAN, Monomethylarsonous acid (MMA(III)) and arsenite: LD50 in hamsters and in vitro inhibition of pyruvate dehydrogenase. *Chemical Research in Toxicology*, 2001. 14(6): 651-656.

- PONGRATZ, R., Arsenic speciation in environmental samples of contaminated soil. *The Science of The Total Environment*, 1998. 224(1-3): 133-141.
- PORTER, E.K. & P.J. PETERSON, Arsenic accumulation by plants on mine waste (United Kingdom). *Science of The Total Environment*, 1975. 4(4): 365-371.
- RAAB, A., H.R. HANSEN, L.Y. ZHUANG & J. FELDMANN, Arsenic accumulation and speciation analysis in wool from sheep exposed to arsenosugars. *Talanta*, 2002. 58(1): 67-76.
- RANA, T., S. SARKAR, T.K. MANDAL & S. BATABYAL, Haematobiochemical profiles of affected cattle at arsenic prone zone in Haringhata block of Nadia District of West Bengal in India. *The Internet Journal of Hematology*, 2008. 4(2).
- REHNER, G. & H. DANIEL, *Biochemie der Ernährung*. Spektrum Akademischer Verlag, 2002. 601 Seiten, ISBN 3827411572.
- REICHL, F.X., L. SZINICZ, H. KREPPPEL & W. FORTH, Effects on mitochondrial metabolism in livers of guinea-pigs after a single or repeated injection of As₂O₃. *Archives of Toxicology*, 1989. 63(5): 419-422.
- REIN, K.A., B. BORREBAEK & J. BREMER, Arsenite inhibits [beta]-oxidation in isolated rat liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1979. 574(3): 487-494.
- RENZ, H., *Integrative klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin: Pathophysiologie, Pathobiochemie, Hämatologie*, Walter de Gruyter, 2003. 684 Seiten, ISBN 3110173670.
- RIEGER, E., G. SCHRÖDER & P. SCHMOLDT, Untersuchungen zur Auswirkung verschiedener Fußbodenvarianten auf die Klauen von Schafen. *Archiv für experimentelle Veterinärmedizin*, 1984. 38: 757-764. Zitiert in: Erlewein, S., *Genetische Untersuchungen über Klauenmerkmale beim Merinoland- und Rhönschaf*. Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin, 2002.
- RINGER, R.K., Effects on domestic animals. In: Bourdeau, P., J.A. Haines, W. Klein & C.R. Krishna Murti, *Ecotoxicology and Climate*. SCOPE 38, John Wiley & Sons Ltd, 1989. 412 Seiten, ISBN 0471918318.
- RODEHUTSCORD, M., M. KAPOCIUS, R. TIMMLER & A. DIECKMANN, 2004. Linear regression approach to study amino acid digestibility in broiler chickens. *British Poultry Science*, 2004. 45(1): 85-89.

- ROMEO L., P. APOSTOLI, M. KOVACIC, S. MARTINI & F. BRUGNONE, Acute arsine intoxication as a consequence of metal burnishing operations. *American Journal of Industrial Medicine*, 1997. 32(3): 211-216.
- ROSAS, I., R. BELMONT, A. ARMIENTA & A. BAEZ, Arsenic concentrations in water, soil, milk and forage in Comarca Lagunera, Mexico. *Water Air and Soil Pollution*, 1999. 112(1-2): 133-149.
- ROSEN, B.P., Biochemistry of arsenic detoxification. *Febs Letters*, 2002. 529(1): 86-92.
- SADLER, R., H. OLSZOWY, G. SHAW, R. BILTOFT & D. CONNELL, Soil and water contamination by arsenic from a tannery waste. *Water Air and Soil Pollution*, 1994. 78(1-2): 189-198.
- SALLMANN, H.P. & H. FUHRMANN, Physiologische Aspekte der Leberfunktion. In: Engelhardt, W. von, G. Breves, F. Ahrens, *Physiologie der Haustiere*. Georg Thieme Verlag, 2005. 682 Seiten, ISBN 3830410395.
- SALTIKOV, C.W. & D.K. NEWMAN, Genetic identification of a respiratory arsenate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003. 100(19): 10983-10988.
- SANTINI, J.M., L.I. SLY, R.D. SCHNAGL & J.M. MACY, A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: Phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000. 66(1): 92-97.
- SCAN, Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on undesirable Substances in Feed. European Commission; Health & Consumer Protection Directorate-General, 2003.
- SCHMÖGER, M.E.V., M. OVEN & E. GRILL, Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiology*, 2000. 122(3): 793-801.
- SCHRÖDER, B., H. KÄPPNER, K. FAILING & E. PFEFFER, Mechanisms of intestinal phosphate transport in small ruminants. *British Journal of Nutrition*, 1995. 74(05): 635-648.
- SCHUHMACHER-WOLZ, U., K. SCHNEIDER & D. KLEIN, Bewertungsmaßstäbe für Arsen in Böden, Grund- und Trinkwasser, Teil A Bericht zur toxikologischen Bewertung. Endbericht zur Toxikologie; Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, 2007.
- SCHWAB, D.A. & J.E. WILSON, Complete amino acid sequence of the type III isozyme of rat hexokinase, deduced from the cloned cDNA. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1991. 285(2): 365-370.

- SCHWARTZ, R., Beurteilung der Stoffeinträge über frische Schlämme für die Böden in der rezenten Aue und in zukünftigen Außendeichsflächen der unteren Mittelelbe. *Hamburger Bodenkundliche Arbeiten*, 1999. 44: 84-92.
- SCOTT, N., K.M. HATLELID, N.E. MACKENZIE & D.E. CARTER, Reactions of arsenic(III) and arsenic(V) species with glutathione. *Chemical Research in Toxicology*, 1993. 6(1): 102-106.
- SELBY, L.A., A.A. CASE, C.R. DORN & D.J. WAGSTAFF, Public health hazards associated with arsenic poisoning in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1974. 165: 1010-1014.
- SHEABAR, F.Z. & S. YANNAL, *In vitro* effects of cadmium and arsenite on glutathione peroxidase, aspartate and alanine aminotransferases, cholinesterase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in blood. *Veterinary and Human Toxicology*, 1989. 31(6): 528-531.
- SHEN, Z.X., G.Q. CHEN, J.H. NI, X.S. LI, S.M. XIONG, Q.Y. QIU, J. ZHU, W. TANG, G.L. SUN, K.Q. YANG, Y. CHEN, L. ZHOU, Z.W. FANG, Y.T. WANG, J. MA, P. ZHANG, T.D. ZHANG, S.J. CHEN, Z. CHEN & Z.Y. WANG, Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood*, 1997. 89(9): 3354-3360.
- SHIOMI, K., M. CHINO & T. KIKUCHI, Metabolism in mice of arsenic compounds contained in the red alga *Porphyra Yezoensis*. *Applied Organometallic Chemistry*, 1990. 4(3): 281-286.
- SHIRAZI-BEECHEY, S.P., B.A. HIRAYAMA, Y. WANG, D. SCOTT, M.W. SMITH & E.M. WRIGHT, Ontogenic development of lamb intestinal sodium-glucose co-transporter is regulated by diet. *The Journal of Physiology*, 1991. 437(1): 699-708.
- SIERRA-ALVAREZ, R., I. CORTINAS, U. YENAL & J.A. FIELD, Methanogenic inhibition by arsenic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004. 70(9): 5688-5691.
- SILVER, S., K. BUDD, K.M. LEAHY, W.V. SHAW, D. HAMMOND, R.P. NOVICK, G.R. WILLSKY, M.H. MALAMY & H. ROSENBERG, Inducible plasmid-determined resistance to arsenate, arsenite, and antimony(III) in *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus*. *Journal of Bacteriology*, 1981. 146(3): 983-996.
- SILVER, S. & L.T. PHUNG, Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annual Review of Microbiology*, 1996. 50(1): 753-789.

- SILVER, S. & L.T. PHUNG, Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005. 71(2): 599-608.
- SIMSEK, O., R. GULTEKIN, O. OKSUZ & S. KURULTAY, The effect of environmental pollution on the heavy metal content of raw milk. *Nahrung-Food*, 2000. 44(5): 360-363.
- SMEDLEY, P.L., Arsenic in groundwater – South and East Asia. In: Welch, A.H. & K.G. Stollenwerk, *Arsenic in Ground Water: Geochemistry and Occurrence*. Springer, 2003. 475 Seiten, ISBN 1402073178.
- SMEDLEY, P.L. & D.G. KINNIBURGH, A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, 2002. 17(5): 517-568.
- SMITH, P.K., R.I. KROHN, G.T. HERMANSON, A.K. MALLIA, F.H. GARTNER, M.D. PROVENZANO, E.K. FUJIMOTO, N.M. GOEKE, B.J. OLSON & D.C., KLENK, Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 1985. 150(1): 76-85.
- SMITH, A.H., C. HOPENHAYNRICH, M.N. BATES, H.M. GOEDEN, I. HERTZPICCIOTTO, H.M. DUGGAN, R. WOOD, M.J. KOSNETT & M.T. SMITH, Cancer risks from arsenic in drinking-water. *Environmental Health Perspectives*, 1992. 97: 259-267.
- SMITH, A.H., E.O. LINGAS & M. RAHMAN, Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bulletin of the World Health Organization*, 2000. 78(9): 1093-1103.
- SNELLER, F.E.C., L.M. VAN HEERWAARDEN, F.J.L. KRAAIJEVELD-SMIT, W.M. TEN BOOKUM, P.L.M. KOEVOETS, H. SCHAT & J.A.C. VERKLEIJ, Toxicity of arsenate in *Silene vulgaris*, accumulation and degradation of arsenate-induced phytochelatins. *New Phytologist*, 1999. 144(2): 223-232.
- SOENGAS, J.L., S. POLAKOF, X. CHEN, S. SANGIAO-ALVARELLOS & T.W. MOON, Glucokinase and hexokinase expression and activities in rainbow trout tissues: changes with food deprivation and refeeding. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2006. 291(3): 810-821.
- STOLZ, J.F. & R.S. OREMLAND, Bacterial respiration of arsenic and selenium. *Fems Microbiology Reviews*, 1999. 23(5): 615-627.
- STOLZ, J.E., P. BASU, J.M. SANTINI & R.S. OREMLAND, Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annual Review of Microbiology*, 2006. 60: 107-130.

- STOLZ, J.F., E. PERERA, B. KILONZO, B. KAIL, B. CRABLE, E. FISHER, M. RANGANATHAN, L. WORMER & P. BASU, Biotransformation of 3-nitro-4-hydroxybenzene arsonic acid (roxarsone) and release of inorganic arsenic by *Clostridium* species. *Environmental Science & Technology*, 2007. 41(3): 818-823.
- SUR, R., H. HAJIMIRAGHA, J. BEGEROW & L. DUNEMANN, Arsen-Metabolismus im Menschen (Kopplung von Festphasenmikroextraktion und GC-MS). *Chemie in unserer Zeit*, 2003. 37(4): 248-256.
- TAM, G.K.H., S.M. CHARBONNEAU, F. BRYCE, C. POMROY & E. SANDI, Metabolism of inorganic arsenic (as-74) in humans following oral ingestion. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1979. 50(2): 319-322.
- TANAKA, T., Y. HARANO, H. MORIMURA & R. MORI, Evidence for the presence of two types of pyruvate kinase in rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1965. 21(1): 55-60.
- TANAKA, T., Y. HARANO, F. SUE & H. MORIMURA, Crystallization, characterization and metabolic regulation of two types of pyruvate kinase isolated from rat tissues. *The Journal of Biochemistry*, 1967. 62(1): 71-91.
- THORNTON, I. & P.ABRAHAMS, Soil ingestion - a major pathway of heavy-metals into livestock grazing contaminated land. *Science of the Total Environment*, 1983. 28(Jun): 287-294.
- TOYAMA, M., M.YAMASHITA, N. HIRAYAMA & Y. MUROOKA, Interactions of arsenic with human metallothionein-2. *The Journal of Biochemistry*, 2002. 132(2): 217-221.
- TSENG, C.H., The potential biological mechanisms of arsenic-induced diabetes mellitus. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004. 197(2): 67-83.
- TSENG, W.P., H.M. CHU, S.W. HOW, J.M. FONG, C.S. LIN & S. YEH, Prevalence of skin cancer in an endemic area of chronic arsenism in Taiwan. *Journal of the National Cancer Institute*, 1968. 40(3): 453-463.
- TSENG, W.P., Effects and dose-response relationship of skin cancer and blackfoot disease with arsenic. *Environmental Health Perspectives*, 1977. 19: 109-119.
- TURPEINEN, R., M. PANTSAR-KALLIO, M. HAGGBLOM & T. KAIRESALO, Influence of microbes on the mobilization, toxicity and biomethylation of arsenic in soil. *Science of the Total Environment*, 1999. 236(1-3): 173-180.
- TURPEINEN, R., M. PANTSAR-KALLIO & T. KAIRESALO, Role of microbes in controlling the speciation of arsenic and production of arsines in contaminated soils. *The Science of The Total Environment*, 2002. 285(1-3): 133-145.

- UFZ, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung, Arsen – neue Sorgen mit einem altbekannten Gift. Lebensräume, Magazin des Umweltforschungszentrums Leipzig-Halle in der Helmholtz-Gemeinschaft, 2002. 10: 6-9.
- UFZ, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung, Pressemitteilung vom 29. August 2003: Wie steht es um die Schadstoffbelastung von Elbe und Mulde ein Jahr nach der Flut? Ergebnisse der Tagung des ad-hoc-Projektes vom 27. bis 29. August 2003 in Freiberg, 2003.
- ULLRICH-EBERIUS, C.I., A. SANZ & A.J. NOVACKY, Evaluation of arsenate- and vanadate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba* G1. The Journal of Experimental Botany, 1989. 40(1): 119-128.
- Umweltbundesamt, Stoffmonographie Arsen - Referenzwert für Urin. Stellungnahme der Kommission "Human Biomonitoring" des Umweltbundesamtes. Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz, 2003. 46(12): 1098-1106.
- U.S. EPA, U.S. Environmental Protection Agency, 2008. Integrated Risk Information System (IRIS) online.
<http://www.epa.gov/ncea/iris/subst/0278.htm> (04.2009)
- UTHUS, E.O., Evidence for Arsenic Essentiality. Environmental Geochemistry and Health, 1992. 14(2): 55-58.
- UTHUS, E.O., Arsenic essentiality: A role affecting methionine metabolism. Journal of Trace Elements in Experimental Medicine, 2003. 16(4): 345-355.
- VAHTER, M., Species-differences in the metabolism of arsenic compounds. Applied Organometallic Chemistry, 1994. 8(3): 175-182.
- VAHTER, M. & H. NORIN, Metabolism of ⁷⁴As-labeled trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice. Environmental Research, 1980. 21(2): 446-457.
- VAN SOEST, P.F., Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. 2. A rapid method for the determination of fibre and lignin. Journal of the Association of Official Agricultural Chemists, 1963. 46: 829-835.
- VÁRADYOVÁ, Z., K. MIHALIKOVA, S. KISIDAYOVA & P. JAVORSKY, Fermentation pattern of the rumen and hindgut inocula of sheep grazing in an area polluted from the non-ferrous metal industry. Czech Journal of Animal Science, 2006. 51(2): 66-72.
- VÖGELI-LANGE, R. & G.J. WAGNER, Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. Plant Physiology, 1990. 92: 1086-1093.

- WAALKES, M.P., J.M. WARD, J. LIU & B.A. Diwan, Transplacental carcinogenicity of inorganic arsenic in the drinking water: induction of hepatic, ovarian, pulmonary, and adrenal tumors in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2003. 186(1): 7-17.
- WHO (World Health Organization), Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Twenty-seventh Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, 1983. WHO Food Additives Series, No. 18. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v18je17.htm> (03.2009)
- WHO (World Health Organization), Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Thirty-third Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, 1989. WHO Food Additives Series, No. 24. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v024je08.htm> (03.2009)
- WILSON, R.H. & H.B. LEWIS, The cystine content of hair and other epidermal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 1927. 73(2): 543-553.
- WILSON, S., J.C. MACRAE & P.J. BUTTERY, Glucose production and utilization in non-pregnant, pregnant and lactating ewes. *British Journal of Nutrition*, 1983. 50(2): 303-316.
- WILSON, J.E. Hexokinases. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 1995. 126: 65-198. Zitiert in: Osawa, H., C. Sutherland, R.B. Robey, R.L. Printz & D.K. Granner, Analysis of the signaling pathway involved in the regulation of hexokinase II gene transcription by insulin. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. 271(28): 16690-16694.
- WITTSIEPE, J., P. SCHREY & M. WILHELM, Duplikatstudie zur Untersuchung der Aufnahme von Arsen, Blei, Cadmium, Chrom, Nickel, Quecksilber, Selen, Zink, PCDD/F und PAK über die Nahrung bei Kindern: Teil I, Berichtsband. Umweltbundesamt, 2000.
- WOOLSON, E.A., Persistence and chemical distribution of arsanilic acid in 3 Soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1975. 23(4): 677-681.
- WOOLSON, E.A., Fate of arsenicals in different environmental substrates. *Environmental Health Perspectives*, 1977. 19(Aug): 73-81.
- YAMADA, K. & T. NOGUCHI, Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *The Biochemical Journal*, 1999. 337(Jan): 1-11.
- YAMAUCHI, H. & Y. YAMAMURA, Concentration and chemical species of arsenic in human tissue. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1983. 31(3): 267-270.

- YANEZ, J., V. FIERRO, H. MANSILLA, L. FIGUEROA, L. CORNEJO & R. M. BARNES, Arsenic speciation in human hair: a new perspective for epidemiological assessment in chronic arsenicism. *Journal of Environmental Monitoring*, 2005. 7(12): 1335-1341.
- YOST, L.J., R.A. SCHOOF & R. AUCOIN, Intake of inorganic arsenic in the North American diet. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 1998. 4(1): 137-152.
- ZAUNMÜLLER, T., M. EICHERT, H. RICHTER & G. UNDEN, Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006. 72(3): 421-429.
- ZHAO, F.J., S.J. DUNHAM & S.P. MCGRATH, Arsenic hyperaccumulation by different fern species, rapid report. *New Phytologist*, 2002. 156(1): 27-31.
- ZHONG, S., A.H. WYLLIE, D. BARNES, C.R. WOLF & N.K. SPURR, Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis*, 1993. 14(9): 1821-1824.
- ŽVORC, Z., V. MRLJAK, V. SUŠIÆ & J. POMPE GOTAL, Haematological and biochemical parameters during pregnancy and lactation in sows. *Veterinarski Arhiv*, 2006. 76(3): 245-253.

Anhang

Anhangsabbildungen

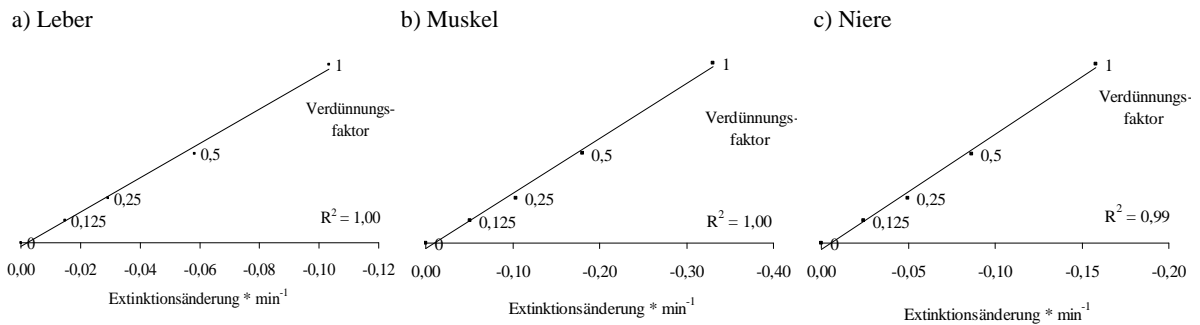


Abbildung A1: Verdünnungsreihe des Homogenates zur Überprüfung der Proportionalität zwischen Enzymmenge und gemessener Enzymaktivität der Pyruvatkinase-katalysierten Reaktion in den Geweben

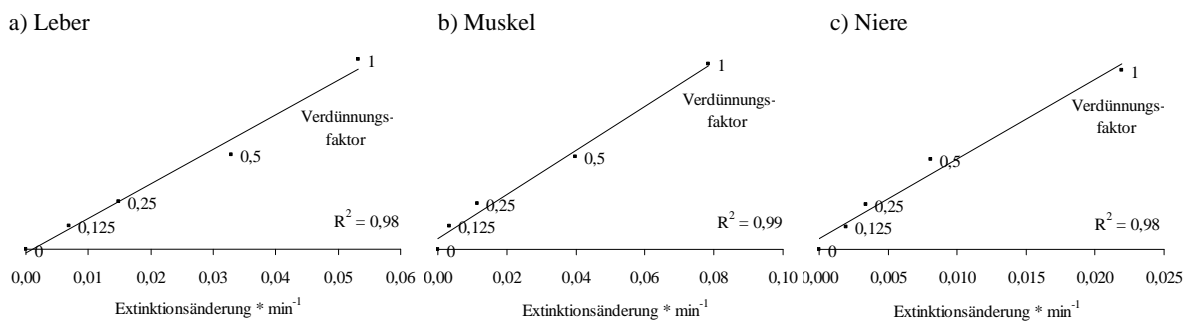


Abbildung A2: Verdünnungsreihe des Homogenates zur Überprüfung der Proportionalität zwischen Enzymmenge und gemessener Enzymaktivität in der Glukokinase- und Hexokinase-katalysierten Reaktion in den Geweben

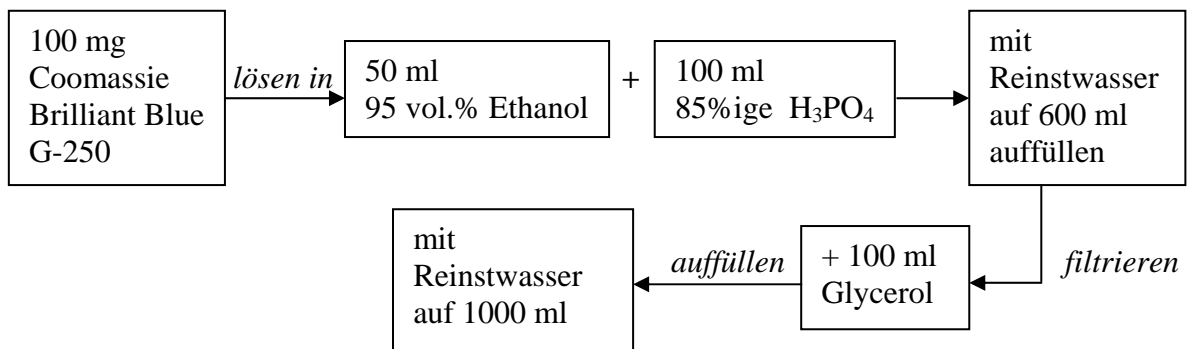


Abbildung A3: Herstellung und Zusammensetzung des Bradford-Reagenzes (BRADFORD, 1976, modifiziert nach KLEBER *et al.*, 1988)

1 Met Ala Ala Ile Glu Pro Ser Gly Leu His Pro Gly Glu Arg Asp Ser Ser Cys Pro Gln Glu Gly Ile Pro
 25 Arg Pro Ser Gly Ser Leu Glu Leu Ala Gln Glu Tyr Leu Gln Gln Phe Lys Val Thr Met Thr Gln Leu
 48 Gln Gln Ile Gln Ala Ser Leu Leu Cys Ser Met Glu Gln Ala Leu Lys Gly Gln Asp Ser Pro Ala Pro
 71 Ser Val Arg Met Leu Pro Thr Tyr Val Arg Ser Thr Pro His Gly Thr Glu Gln Gly Asp Phe Leu Val
 94 Leu Glu Leu Gly Ala Thr Gly Ala Ser Leu Arg Val Leu Trp Val Thr Leu Thr Gly Thr Lys Glu His
 117 Ser Val Glu Thr Arg Ser Gln Glu Phe Val Ile Pro Gln Glu Val Ile Leu Gly Ala Gly Gln Gln Leu Phe
 141 Asp Phe Ala Ala Arg Cys Leu Ser Glu Phe Leu Asp Ala Tyr Pro Val Glu Asn Gln Gly Leu Lys Leu
 164 Glu Phe Asn Phe Ser Phe Pro Cys His Gln Thr Gly Leu Asp Lys Ser Thr Leu Ile Ser Trp Thr Lys
 187 Gly Phe Arg Cys Ser Gly Val Glu Gly Gln Asp Val Val Gln Leu Leu Arg Asp Ala Ile Gln Arg Gln
 210 Gly Thr Tyr Asn Ile Asp Val Val Ala Met Val Asn Asp Thr Val Gly Thr Met Met Gly Cys Glu Leu
 233 Gly Thr Arg Pro Cys Glu Val Gly Leu Ile Val Asp Thr Gly Thr Asn Ala Cys Tyr Met Glu Glu Ala
 256 Arg His Val Ala Ala Leu Asp Glu Asp Arg Gly Arg Thr Cys Val Ser Ile Glu Trp Gly Ser Phe Tyr
 279 Asp Glu Glu Ala Leu Gly Pro Val Leu Thr Thr Phe Asp Asp Ala Lys Asp His Glu Ser Leu Val Pro
 302 Gly Ala Gln Arg Phe Glu Lys Met Ile Gly Gly Leu Tyr Leu Gly Glu Leu Val Arg Leu Val Leu Val
 325 His Leu Ser Gln His Gly Val Leu Phe Gly Gly Cys Ala Ser Pro Ala Leu Leu Ser Gln Asn Ser Ile
 348 Leu Leu Glu His Val Ala Lys Met Glu Asp Pro Ala Thr Gly Ile Ala His Val His Thr Val Leu Gln
 371 Gly Leu Gly Leu Ser Pro Gln Ala Ser Asp Ala Glu Leu Val Gln Arg Val Cys Met Ala Val Lys Thr
 394 Arg Ala Ala Gln Leu Cys Ala Ser Ala Leu Ala Ala Val Leu Ser Arg Leu Gln His Ser Arg Glu Gln
 417 Gln Thr Leu His Val Ala Val Ala Thr Gly Gly Arg Val Phe Glu Trp His Pro Arg Phe Leu Cys Ile
 440 Leu Lys Glu Thr Val Met Leu Leu Ala Pro Glu Cys Asp Val Ser Phe Ile Pro Ser Val Asp Gly Gly
 463 Gly Arg Gly Val Ala Met Val Thr Ala Val Ala Ala Arg Leu Ala Thr His Arg Arg Ile Leu Glu Glu
 486 Thr Leu Ala Pro Phe Gln Leu Ser Leu Glu Gln Leu Thr Ala Val Gln Ala Gln Met Arg Glu Ala Met
 509 Ile Arg Gly Leu Gln Gly Glu Ser Ser Ser Leu Arg Met Leu Pro Thr Tyr Val Arg Ala Thr Pro Asp
 532 Gly Ser Glu Arg Gly Asp Phe Leu Ala Leu Asp Leu Gly Gly Thr Asn Phe Arg Val Leu Leu Val Arg
 555 Val Ala Glu Gly Ser Val Gln Ile Thr Asn Gln Val Tyr Ser Ile Pro Glu Tyr Val Ala Gln Gly Ser Gly
 579 Gln Lys Leu Phe Asp His Ile Val Asp Cys Ile Val Asp Phe Gln Lys Arg Gln Gly Leu Ser Gly Gln
 602 Ser Leu Pro Leu Gly Phe Thr Phe Ser Phe Pro Cys Lys Gln Leu Gly Leu Asp Gln Gly Ile Leu Leu
 625 Asn Trp Thr Lys Gly Phe Asn Ala Ser Gly Cys Glu Gly Gln Asp Val Val Tyr Leu Leu Arg Glu Ala
 648 Ile Arg Arg Arg Gln Ala Val Glu Leu Asn Val Val Ala Ile Val Asn Asp Thr Val Gly Thr Met Met
 671 Ser Cys Gly Tyr Asp Asp Pro Cys Cys Glu Met Gly Leu Ile Val Gly Thr Gly Thr Asn Ala Cys Tyr
 694 Met Glu Glu Leu Arg Asn Val Ala Ser Val Pro Gly Asp Ser Gly His Met Cys Ile Asn Met Glu Trp
 717 Gly Ala Phe Gly Asp Asp Gly Ser Ser Met Leu Gly Thr Cys Phe Asp Ala Ser Val Asp Gln Ala Ser
 741 Ile Asn Pro Gly Lys Gln Arg Phe Glu Lys Met Ile Ser Gly Met Tyr Leu Gly Glu Ile Val Arg His Ile
 765 Leu Leu His Leu Thr Ser Leu Gly Val Leu Phe Arg Gly Gln Lys Thr Gln Cys Leu Gln Thr Arg Asp
 788 Ile Phe Lys Thr Lys Phe Leu Ser Glu Ile Glu Ser Asp Ser Leu Ala Leu Arg Gln Val Arg Ala Ile Leu
 812 Glu Asp Leu Gly Leu Thr Leu Thr Ser Asp Asp Ala Leu Met Val Leu Glu Val Cys Gln Ala Val Ser
 835 Arg Arg Ala Ala Gln Leu Cys Gly Ala Gly Val Ala Ala Val Val Glu Lys Ile Arg Glu Asn Arg Gly
 858 Leu Gln Glu Leu Thr Val Ser Val Gly Val Asp Gly Thr Leu Tyr Lys Leu His Pro His Phe Ser Arg
 881 Leu Val Ser Val Thr Val Arg Lys Leu Ala Pro Gln Cys Thr Val Thr Phe Leu Gln Ser Glu Asp Gly
 904 Ser Gly Lys Gly Ala Ala Leu Val Thr Arg Val Ala Cys Arg Leu Thr Gln Met Ala Cys Val

Abbildung A4: Aminosäuresequenz der Hexokinase III in der Ratte; Cystein wurde grau hinterlegt (nach SCHWAB & WILSON, 1991)

1 Met Glu Gly Pro Ala Gly Tyr Leu Arg Arg Ala Ser Val Ala Gln Leu Thr Gln Glu Leu Gly Thr Ala
 24 Phe Phe Gln Gln Gln Gln Leu Pro Ala Ala Met Ala Asp Thr Phe Leu Glu Met Leu Cys Leu Leu
 46 Asp Ile Asp Ser Gln Pro Val Ala Ala Arg Ser Thr Ser Ile Ile Ala Thr Ile Gly Pro Ala Ser Arg Ser
 70 Val Asp Arg Leu Lys Glu Met Ile Lys Ala Gly Met Asn Thr Ala Arg Leu Asn Ser Phe His Gly Ser
 93 His Glu Tyr His Ala Glu Ser Ile Ala Asn Ile Arg Glu Ala Thr Glu Ser Phe Ala Thr Ser Pro Leu Ser
 117 Tyr Arg Pro Val Ala Ile Ala Leu Asp Thr Lys Gly Pro Glu Ile Arg Thr Gly Val Leu Gln Gly Gly
 140 Pro Glu Ser Glu Val Glu Ile Val Lys Gly Ser Gln Val Leu Val Thr Val Asp Pro Lys Phe Gln Thr
 163 Arg Gly Asp Ala Lys Thr Val Trp Val Asp Tyr His Asn Ile Thr Arg Val Val Ala Val Gly Gly Arg
 186 Ile Tyr Ile Asp Asp Gly Leu Ile Ser Leu Val Val Gln Lys Ile Gly Pro Glu Gly Leu Val Thr Glu Val
 210 Glu His Gly Gly Ile Leu Gly Ser Arg Lys Gly Val Asn Leu Pro Asn Thr Glu Val Asp Leu Pro Gly
 233 Leu Ser Glu Gln Lys Leu Leu Asp Leu Arg Phe Gly Val Gln His Asn Val Asp Ile Ile Phe Ala Ser
 256 Phe Val Arg Lys Ala Ser Asp Val Leu Ala Val Arg Asp Ala Leu Gly Pro Glu Gly Gln Asn Ile Lys
 279 Ile Ile Ser Asp Ile Glu Asn His Glu Gly Val Lys Lys Phe Asp Glu Ile Leu Glu Tyr Ser Asp Gly Ile
 293 Met Val Ala Arg Asp Gly Leu Gly Ile Glu Ile Pro Ala Glu Lys Val Phe Leu Ala Gln Lys Met Met
 316 Ile Gly Arg Cys Asn Leu Ala Gly Lys Pro Val Val Cys Ala Thr Gln Met Leu Glu Ser Met Ile Thr
 339 Lys Ala Arg Pro Thr Arg Ala Glu Thr Ser Asp Val Ala Asn Ala Val Leu Asp Gly Ala Asp Cys Ile
 362 Met Leu Ser Gly Glu Thr Ala Lys Gly Ser Phe Pro Val Glu Ala Val Met Met Gln His Ala Ile Ala
 385 Arg Glu Ala Glu Ala Ala Val Tyr His Arg Gln Leu Phe Glu Glu Leu Arg Arg Ala Ala Pro Leu Ser
 409 Arg Asp Pro Thr Glu Val Thr Ala Ile Gly Ala Val Glu Ala Ser Phe Lys Cys Cys Ala Ala Ala Ile Ile
 433 Val Leu Thr Lys Thr Gly Arg Ser Ala Gln Leu Leu Ser Gln Tyr Arg Pro Arg Ala Ala Val Ile Ala
 456 Val Thr Arg Ser Ala Gln Ala Ala Arg Gln Val His Leu Ser Arg Gly Val Phe Pro Leu Leu Tyr Arg
 479 Glu Pro Pro Glu Ala Ile Trp Ala Asp Asp Val Asp Arg Arg Val Gln Phe Gly Ile Glu Ser Gly Lys
 502 Leu Arg Gly Phe Leu Arg Val Gly Asp Leu Val Ile Val Val Thr Gly Trp Arg Pro Gly Ser Gly Tyr
 525 Thr Asn Ile Met Arg Val Leu Ser Val Ser

Abbildung A5: Aminosäurefrequenz der Pyruvatkinase in der Rattenleber; Cystein wurde grau hinterlegt (modifiziert nach MUIRHEAD *et al.*, 1986)

Anhangstabellen**Tabelle A1:** Zusammensetzung, Inhaltsstoff- und Zusatzstoffgehalte des Konzentratfutters „Schäferstolz“ – Ergänzungsfuttermittel für Zuchtschafe

Zusammensetzung	Inhaltsstoffe (%)	Zusatzstoffe/kg
Weizen	Rohprotein 15,0	10.000 I.E. Vit. A
Weizenkleie	Rohfett 3,85	1.250 I.E. Vit. D3
Rapskuchen	Rohfaser 8,90	40 mg Vit. E
Luzernegrünmehl	Rohasche 8,55	
Zuckerrübenmeslasse	Ca 1,50	
Sojaextraktionsschrot	P 0,55	
Mineralfutter	Na 0,35	
CaCO ₃		
NaCl		

Tabelle A2: Inhaltsstoff- und Zusatzstoffgehalte des BASU-Mineralfutters für Schafe, Rezept-Nr. 9501

Inhaltsstoffe (%)	Zusatzstoffe mg/kg
Calcium 17,0	Vit. E 1000
Phosphor 7,5	Mn 2000
Natrium 13,0	Zn 3000
Magnesium 2,0	I 60
	Se 30
	Co 15

Tabelle A3: Zusammensetzung der Lösungen für das Inkubationsmedium im Versuch zur Gasbildungsdynamik

Lösung	Inhaltsstoffe
Mengenelementlösung	5,7 g Na ₂ HPO ₄ , 6,2 g KH ₂ PO ₄ , 0,6 g MgSO ₄ · 7H ₂ O in 1000 ml dest. Wasser gelöst
Spurenelementlösung	13,2 g CaCl ₂ · 2H ₂ O, 10 g MnCl ₂ · 4H ₂ O, 1 g CoCl ₂ · 6H ₂ O, 8 g FeCl ₃ · 6H ₂ O in 100 ml dest. Wasser gelöst
Pufferlösung	35 g NaHCO ₃ , 4 g NH ₄ HCO ₃ in 1000 ml dest. Wasser gelöst
Resazurinlösung	100 mg C ₁₂ H ₆ NNaO ₄ in 100 ml dest. Wasser gelöst
Reduktionslösung	zu 47,5 ml dest. Wasser: 2 ml NaOH, 285 mg Na ₂ S · 9H ₂ O

Tabelle A4: Kalkulierte und analysierte Arsengehalte, Trockenmasse, Rohnährstoff- und Energiegehalt der Rationen im Verdaulichkeitsversuch ohne (-) und mit (+) Zusatz von arsenhaltiger Erde

Ration	Arsen in der Erde	Arsengehalt der Ration	Arsengehalt der Ration	T	XA	XP	XL	XF	OS	ME*
		(kalkuliert)	(analysiert)							
		(mg/kg T)	(mg/kg T)	(g/kg FM)			(g/kg T)		(MJ/kg T)	
Grassilage	-	-	0,31	606	125	117	9,6	351	875	7,59
	+	15,0	17,8	586	205	115	10,6	299	795	6,46
Grünfutter	-	-	0,58	229	149	136	22,1	291	851	7,42
	+	15,7	23,1	269	285	94	12,0	244	715	6,18
Heu	-	-	0,33	918	67	154	18,5	298	933	8,91
	+	17,0	4,2	901	104	136	15,0	284	896	8,39

+ - hoch, - - gering, T – Trockenmasse, XA – Rohasche, XP – Rohprotein, XL – Rohfett, XF – Rohfaser, OS – organische Substanz, ME – Umsetzbare Energie, FM – Frischmasse

* berechnet nach GfE, 2001

Tabelle A5: Höhe der Dosierung von anorganischen Arsenverbindungen zur Kontamination von 20 g Grassilage (94,2 % T) für den HFT

Variante (mg As/kg T)	Zugabe Arsenverbindung (mg)
HNa ₂ AsO ₄ · 7H ₂ O (Na-Arsenat) (Arsengehalt im Molekül 24,01 %)	
0	0
2	0,156
5	0,392
10	0,786
20	1,569
50	3,924
As ₂ O ₃ (Arsentrioxid) (Arsengehalt im Molekül 75,74 %)	
0	0
2	0,049
5	0,124
10	0,249
20	0,497
50	1,243

Tabelle A6: Höhe der Dosierung von anorganischen Arsenverbindungen zur Kontamination von 15 g Grassilage (91,2 % T) für die Pansensimulation

Variante (mg As/kg T)	Zugabe Arsenverbindung je Futterbeutel (mg)	
	HNa ₂ AsO ₄ · 7H ₂ O (Na-Arsenat) (Arsengehalt im Molekül 24,01 %)	As ₂ O ₃ (Arsentrioxid) (Arsengehalt im Molekül 75,74 %)
0	-	-
5	0,284	0,090
20	1,139	0,361

Tabelle A7: Zusammensetzung der Pufferlösung in der Pansensimulation (in Anlehnung an MCDougall, 1948)

Substanz	Einwaage (g/l)
NaCl	0,468
KCl	0,570
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,032
MgCl ₂ · 12H ₂ O	0,128
Na ₂ PO ₄ · 12H ₂ O	9,383
NaHCO ₃	9,905
NH ₄ Cl	0,0378

Tabelle A8: Trockenmasse, Rohnährstoffe und Menge an Futterresten und Hammelkot bei Vorlage der Grassilage ohne („Kontrolle“) oder mit („Erde“) Zusatz von arsenhaltiger Erde (Einzeltierdaten)

Gruppe/Tier		T	OS	XA	XP	XL	XF	Menge
		(g/kg FM)			(g/kg T)			(g FM/d)
<i>Futterreste</i>								
Kontrolle	1	731	829	171	139	18	345	11
	2	851	844	156	131	15	313	25
	3	815	888	113	126	11	417	29
	4	830	865	135	122	9	405	11
Erde	5	771	370	630	77	8	124	215
	6 ⁺							
	7	753	358	642	77	7	113	199
	8	872	361	639	73	8	107	100
<i>Hammelkot</i>								
Kontrolle	1	448	838	162	110	20	340	939
	2	440	838	162	106	18	344	909
	3	487	835	165	109	22	356	830
	4	428	837	163	108	24	356	1013
Erde	5	487	805	195	104	21	342	756
	6 ⁺							
	7	507	813	187	97	20	347	795
	8	474	806	194	105	20	344	874

T – Trockenmasse, OS – organische Substanz, XA – Rohasche, XP – Rohprotein, XL – Rohfett, XF – Rohfaser, FM – Frischmasse

⁺ Futteraufnahme zu gering, daher Ausschluss aus dem Versuch

Tabelle A9: Trockenmasse, Rohnährstoffe und Menge an Futterresten und Hammelkot bei Vorlage des Grünfutters ohne („Kontrolle“) oder mit („Erde“) Zusatz von arsenhaltiger Erde (Einzeltierdaten)

Gruppe/Tier		T	OS	XA	XP	XL	XF	Menge
		(g/kg FM)			(g/kg T)			(g FM/d)
<i>Futterreste</i>								
Kontrolle	1							0
	2							0
	3	360	748	252	91	13	313	239
	4	592	679	322	71	10	312	23
Erde	5	465	694	306	73	8	284	166
	6	916	246	754	37	1	94	26
	7	590	404	596	50	4	160	139
	8	865	210	790	35	2	70	86
<i>Hammelkot</i>								
Kontrolle	1	567	701	299	111	19	250	521
	2	544	725	275	97	20	255	529
	3	567	730	270	102	26	262	466
	4	511	707	293	101	30	243	559
Erde	5	579	580	420	93	29	177	509
	6	600	628	372	93	28	211	519
	7	461	659	341	96	25	229	625
	8	578	622	378	92	26	211	562

T – Trockenmasse, OS – organische Substanz, XA – Rohasche, XP – Rohprotein, XL – Rohfett, XF – Rohfaser, FM – Frischmasse

Tabelle A10: Trockenmasse, Rohnährstoffe und Menge an Futterresten und Hammelkot bei Vorlage von Heu ohne („Kontrolle“) oder mit („Erde“) Zusatz von arsenhaltiger Erde (Einzeltierdaten)

Gruppe/Tier		T	OS	XA	XP	XL	XF	Menge
		(g/kg FM)			(g/kg T)			(g FM/d)
<i>Futterreste</i>								
Kontrolle	1							0
	2							0
	3	900	816	184	135	15	240	120
	4	922	752	248	169	18	223	2
Erde	5	949	393	608	75	5	103	91
	6	968	192	808	51	0	59	11
	7	960	243	757	45	0	69	37
	8	958	234	766	41	1	57	30
<i>Hammelkot</i>								
Kontrolle	1	468	834	167	124	29	259	664
	2	459	837	163	128	30	253	642
	3	478	837	164	122	32	273	565
	4	465	836	164	124	34	248	627
Erde	5	489	768	233	126	32	222	602
	6	526	678	322	102	24	213	682
	7	500	731	270	107	27	234	657
	8	519	692	308	110	29	205	666

Fortsetzung Tabelle A10:

T – Trockenmasse, OS – organische Substanz, XA – Rohasche, XP – Rohprotein, XL – Rohfett, XF – Rohfaser, FM – Frischmasse

Tabelle A11: Arsen im Futter, in den Futterresten, im Harn und im Kot, sowie die mittlere tägliche Exkretion und die ausgeschiedene Arsenmenge im Verdaulichkeitsversuch mit 3 Grasprodukten ohne („Kontrolle“) und mit („Erde“) Zusatz von arsenhaltiger Erde

Gruppe/Tier	Menge _{As} im Futter ⁺	Menge _{As} in den Futter- resten	c _{As} im Harn	V _{Harn}	Menge _{As} im Harn	c _{As} im Kot	m _{Kot}	Menge _{As} im Kot	
	(mg/d)	(mg/d)	(µg/kg)	(l/d)	(µg/d)	(mg/kg T)	(g T/d)	(µg/d)	
<i>Grassilage</i>									
Kontrolle	1	0,30	0,01	44,3	1,51	67,0	0,39	420,3	164,8
	2	0,30	0,02	64,1	1,14	73,1	0,45	399,7	178,0
	3	0,30	0,01	66,3	1,26	83,8	0,44	404,1	177,9
	4	0,30	0,01	65,3	1,16	75,7	0,39	433,8	168,8
Erde	5	14,02	15,18	710,0	1,87	1327,8	4,79	368,4	1763,2
	6*								
	7	14,02	12,90	1168,4	1,05	1222,9	4,23	402,7	1703,7
	8	14,02	8,04	937,9	1,46	1370,8	5,37	414,7	2228,9
<i>Grünfutter</i>									
Kontrolle	1	0,33	0	26,9	1,65	44,5	0,92	294,8	269,9
	2	0,33	0	27,2	1,40	38,0	0,79	287,4	226,8
	3	0,33	0,17	26,0	1,18	30,8	0,61	264,1	162,2
	4	0,33	0,05	26,8	1,34	36,0	0,84	285,4	238,8
Erde	5	10,52	1,86	786,0	1,93	1515,7	18,06	294,6	5318,9
	6	10,52	2,89	954,0	1,18	1128,9	16,31	311,3	5077,3
	7	10,52	6,00	666,0	1,52	1011,2	11,31	288,4	3262,0
	8	10,52	9,35	516,0	1,60	823,0	13,93	324,7	4524,4
<i>Heu</i>									
Kontrolle	1	0,24	0	111,0	1,00	111,0	0,78	311,1	244,0
	2	0,24	0	180,0	0,51	91,8	0,64	294,5	189,6
	3	0,24	0,13	140,0	0,77	108,3	0,59	269,6	159,7
	4	0,24	0,01	131,0	0,86	112,2	0,65	291,5	188,2
Erde	5	12,27	8,01	3140,0	0,70	2187,5	13,25	294,6	3902,7
	6	12,27	1,15	12250,0	0,50	6104,6	23,97	359,2	8609,9
	7	12,27	4,12	6092,0	0,71	4325,3	19,20	328,4	6305,8
	8	12,27	3,01	4234,0	1,14	4812,6	21,87	345,6	7558,4

T – Trockenmasse, d – Tag, c_{As} – Arsenkonzentration, V_{Harn} – Harnvolumen, m_{Kot} – Kotmenge

⁺ Gruppe „Kontrolle“: berechnet aus analysierter Arsenkonzentration, Gruppe „Erde“: berechnet aus kalkulierter Arsenkonzentration

* Futteraufnahme zu gering, daher Ausschluss aus dem Versuch

Tabelle A12: Arsen in der Grassilage (As-Input), in den Überläufen und Futterresten (As-Output) in der Pansensimulation bei der Inkubation der Grassilage mit zugesetztem Arsentrioxid (As^{III}) oder Na-Arsenat (As^V) in jeweils zwei Konzentrationsstufen (n=3)

Variante	Arsen-Input			Arsen-Output				
	Menge Gras- silage (mg As/kg T)	c _{As} Gras- silage (g T/d)	absolute Arsenmenge in der Grassilage (mg/kg T)	absolute Arsenmenge in der Grassilage (mg)	Überlauf mittlere tägliche Menge (ml)	c _{As} (µg/kg)	Futterreste mittlere tägliche Menge (g T)	c _{As} (mg/kg T)
As ^{III}	0			0	547	<12 ⁺	8,3	0,7
	5			0,07	549	<12 ⁺	8,4	4,1
	20	13,7	0,55	0,27	525	31,3	8,5	18,1
As ^V	5			0,07	543	<12 ⁺	8,3	4,9
	20			0,27	562	123,4	8,0	16,1

T – Trockenmasse, d – Tag, c_{As} – Arsenkonzentration

⁺ die Nachweisgrenze für Arsen von 12 µg/kg im Überlauf wurde nicht überschritten

Tabelle A13: Aminosäurekonzentrationen des mikrobiellen Proteins im Pansensimulationsversuch beim Zusatz von Arsentrioxid (As^{III}) oder Na-Arsenat (As^V) zu einer Grassilage in jeweils zwei Konzentrationsstufen (Mittelwert und Standardabweichung; n=3)

Variante (mg As/kg T)	Ala	Arg	Asp	Cys	Glu	Gly	His	Ile	Leu	
	(g/16 g N)									
As ^{III}	0	6,87	4,48	9,63	0,90	11,0	4,74	1,62	4,66	6,72
		0,40	0,48	0,33	0,07	0,43	0,22	0,12	0,20	0,62
	5	6,76	4,45	9,36	0,88	10,74	4,66	1,59	4,52	6,54
		0,61	0,59	0,56	0,11	0,60	0,41	0,18	0,25	0,69
	20	6,61	4,35	9,31	0,87	10,50	4,57	1,57	4,52	6,54
		0,62	0,58	0,70	0,08	0,62	0,41	0,16	0,33	0,74
As ^V	5	6,53	4,45	8,92	0,78	10,20	4,53	1,56	4,31	6,46
		0,58	0,62	0,53	0,06	0,58	0,41	0,16	0,19	0,71
	20	6,53	4,28	9,09	0,84	10,24	4,51	1,54	4,39	6,53
		0,51	0,40	0,90	0,17	0,98	0,36	0,13	0,49	0,54

Ala – Alanin, Arg – Arginin, Asp – Asparagin, Cys – Cystein, Glu – Glutamin, Gly – Glycin, His – Histidin, Ile – Isoleucin, Leu – Leucin

Fortsetzung Tabelle A13:

Variante (mg As/kg T)	Lys	Met	Phe	(g/16 g N)					
				Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	
As III	0	5,99	2,36	4,00	3,54	3,31	4,63	3,26	5,36
		0,18	0,03	0,21	0,29	0,16	0,25	0,06	0,40
	5	5,89	2,29	3,91	3,72	3,25	4,54	3,23	5,21
		0,28	0,11	0,30	0,23	0,23	0,37	0,14	0,52
	20	5,82	2,25	3,86	3,58	3,23	4,51	3,19	5,12
		0,31	0,11	0,32	0,20	0,26	0,40	0,22	0,52
As V	5	5,52	2,14	3,76	3,43	3,11	4,37	3,03	5,06
		0,16	0,08	0,27	0,34	0,22	0,35	0,20	0,47
	20	5,70	2,19	3,79	3,51	3,15	4,41	3,11	5,08
		0,60	0,26	0,34	0,34	0,25	0,37	0,32	0,42

Lys – Lysin, Met – Methionin, Phe – Phenylalanin, Pro – Prolin, Ser – Serin, Thr – Threonin, Tyr – Tyrosin, Val – Valin

Tabelle A14: Trockenmasse, Rohnährstoffgehalte und Faserfraktionen in der Gesamtration im Verdaulichkeitsversuch

Ration ⁺	T	XA	XP	XL	XF	NDF	ADF	OS
	(g/kg FM)			(g/kg T)				
Ration ⁺	612	103	136	30	266	500	311	897

T – Trockenmasse, XA – Rohasche, XP – Rohprotein, XL – Rohfett, XF – Rohfaser, NDF – neutrale Detergenzienfaser, ADF – saure Detergenzienfaser, OS – organische Substanz, FM – Frischmasse

⁺ bestehend aus 500 g Grassilage, 250 g Heu, 150 g Stroh, 200 g Konzentrat

Tabelle A15: Mittlerer Rohnährstoffgehalt und Umsetzbare Energie in der Gesamtration⁺, sowie Menge an täglich aufgenommener Trockenmasse in den (Trächtigkeits-)Stadien der Mutterschafe der Kontroll- (K) und Arsen-Gruppe (As)

Gruppe	XA	XP	(g/kg T)			OS	T/d (g)	ME* (MJ/d)
			XL	XF	OS			
<i>niedertragend</i>								
K	104	148	27	253	896	1236	10,6	
As	105	149	26	253	896	1236	10,6	
<i>hochtragend</i>								
K	107	156	29	248	893	2082	17,8	
As	105	159	27	246	895	2087	17,8	
<i>laktierend</i>								
K	107	150	26	247	893	2926	25,0	
As	107	148	28	247	894	2920	25,0	

T – Trockenmasse, XA – Rohasche, XP – Rohprotein, XL – Rohfett, XF – Rohfaser, OS – organische Substanz, ME – Umsetzbare Energie

⁺ bei Stroh 200g/Tier und Tag angenommen; * berechnet nach GfE, 2001

Tabelle A16: Kalkulierte und tatsächliche Konzentratfutteraufnahme sowie Gesamtarsenaufnahme der Lämmer von der 5. bis zur 8. Lebenswoche (Einzeltierdaten)

Gruppe/ Tier	Konzentratfutteraufnahme (g)		Gesamtaufnahme Arsen (mg)	
	kalkulierte ⁺	tatsächliche		
<i>Variantengetreue Konzentratvorlage</i>				
Kontrolle	1	5200	4983	-
	2	5600	3693	-
	3	5800	5691	-
Arsen	1	5200	5200	337
	2	6000	2809	182
	3	5600	4933	320
<i>„cross-over“-Behandlung*</i>				
Kontrolle	1	5600	735	48
	2	6000	4697	305
	3	4800	4016	261
Arsen	1	6000	2369	-
	2	5200	4123	-
	3	5000	4778	-

⁺ 200 g Konzentrat pro Tier und Tag entsprechend der Anzahl an Lebenstagen von der 5. Woche p.p. bis zur Schlachtung nach der 8. Woche p.p. (24 bis 30 Tage)

* Lämmer der Kontrollgruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. arsenkontaminiertes Konzentrat, Lämmer der Arsengruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. nicht-arsenkontaminiertes Konzentrat

Tabelle A17: Variabilität der Messwerte bei der Bestimmung von Arsenkonzentrationen in einer hergestellten Konzentrationsreihe (n=10)

Arsen- konzentration (µg As/l)	Messwerte		Mittelwert (µg As/l)	Standard- abweichung	Variations- koeffizient	relative Abweichung des Mittelwertes vom Sollwert (%)
	Min	Max				
0	+	9,3	+	-	-	-
5	+	18,1	6,4	6,82	107,5	27
10	1,2	18,2	10,2	6,26	61,6	1,6
20	14,8	31,9	21,8	6,66	30,5	9,1
30	13,8	46,0	29,9	10,33	34,6	0,4
40	36,2	57,9	44,3	6,90	15,6	10,7
50	42,1	65,0	52,8	6,15	11,6	5,6
60	48,0	74,3	63,2	7,84	12,4	5,3
80	73,9	86,4	79,5	4,13	5,2	0,6
100	90,6	109,5	101,4	6,71	6,6	1,4
150	141,6	160,4	148,2	6,01	4,1	1,2
200	189,2	222,3	199,9	10,08	5,0	0
300	283,5	312,9	301,5	7,65	2,5	0,5

⁺ negativer Wert

Tabelle A18: Vergleich der gemessenen Arsenkonzentrationen einer arsenkontaminierten Grassilage mittels ICP-OES und ICP-MS

Menge an zugewetztem Arsen (mg As/kg T)	Analysierte As-Konzentration (mg As/kg T)	
	ICP-OES	ICP-MS
0	n.n.	0,4
2	1,9	1,8
5	3,7	3,4
10	10,1	10,2
20	16,7	18,8
50	45,5	39,3

n.n. – nicht nachweisbar

Tabelle A19: Trockenmasse, Rohnährstoffe, Detergenzienfaser, N-freie Extraktstoffe und Menge der Futterreste und des Hammelkotes im Verdaulichkeitsversuch mit Zusatz von Arsentrioxid im Konzentratfutter

Gruppe/Tier	T	OS	XA	XP	XL	XF	NDF	ADF	NfE	Menge	
											(g/kg FM)
<i>Futterreste</i>											
Kontrolle	1	688	913	87	71	5	415	759	486	422	2,6
	2	712	875	125	103	9	371	644	387	391	4,6
	3	571	706	294	144	12	238	-	-	312	1,7
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arsen	5	794	905	95	91	13	383	639	392	418	19,4
	6	691	840	160	152	24	327	522	321	337	2,5
	7 ⁺										
	8	566	845	155	189	33	290	-	-	333	1,5
<i>Hammelkot</i>											
Kontrolle	1	466	824	176	124	26	313	553	373	361	567
	2	491	811	189	109	23	300	554	354	378	546
	3	496	822	178	114	22	295	559	355	390	545
	4	472	834	166	116	21	303	588	360	394	572
Arsen	5	465	827	173	112	21	295	587	356	399	567
	6	452	823	177	129	24	289	565	378	381	569
	7 ⁺										
	8	512	817	183	119	23	293	574	383	383	509

T – Trockenmasse, OS – organische Substanz, XA – Rohasche, XP – Rohprotein, XL – Rohfett, XF – Rohfaser, NDF – neutrale Detergenzienfaser, ADF – saure Detergenzienfaser, NfE – stickstofffreie Extraktstoffe, FM – Frischmasse

⁺ Futteraufnahme zu gering, daher Ausschluss aus dem Verdaulichkeitsversuch

Tabelle A20: Arsenkonzentration im Harn und im Kot, deren mittlere tägliche Exkretion und ausgeschiedene Arsenmenge im Verdaulichkeitsversuch mit Zusatz von Arsentrioxid im Konzentratfutter

Gruppe/Tier	c_{As} im Harn ($\mu\text{g/kg}$)	V_{Harn} (l/d)	Menge $_{As}$ im Harn ($\mu\text{g/d}$)	c_{As} im Kot (mg/kg T)	m_{Kot} (g T/d)	Menge $_{As}$ im Kot ($\mu\text{g/d}$)	
Kontrolle	1	51,1	887	45,3	0,47	264,12	123
	2	46,6	875	40,8	0,41	268,28	111
	3	30,3	1164	35,3	0,49	270,73	131
	4	73,3	486	35,6	0,67	269,44	181
Arsen	5	3767	676	2547	34,24	264,04	9042
	6	4665	489	2283	34,67	257,07	8913
	7	5757	384	2208	29,14	268,69	7829
	8	1170	1705	1995	43,13	260,45	11233

Tabelle A21: Arsenkonzentration im Kot der Hammel im Laufe des Versuches zur Abreicherung von Arsen aus dem Körper (Einzeltierdaten)

Zeit nach letzter Arsengabe (h)	c_{As} im Kot (mg As/kg T) ⁺			
	Hammel 5	Hammel 6	Hammel 7	Hammel 8
bis 0	42,2	46,2	35,9	45,8
0	29,5		31,6	38,1
0-6		43,1		
6	33,0	29,6	35,7	
6-10				27,9
10				
10-14	30,2		33,6	
14		34,4		
14-18	38,7		31,5	36,9
18		42,4	27,2	25,9
18-22				
22			29,9	
22-26	36,7	42,8		40,6
26			34,5	44,3
26-30	47,3	51,4		
30				
30-34	41,1	42,0	26,8	41,2
34				
34-38	41,0	44,5	25,4	39,6
38			20,4	
38-42	42,9	39,0		
42	43,0	31,6	16,4	35,0
42-46				
46			16,0	25,0
46-50	37,9	19,6		
50	33,9			19,3
50-54		17,5	16,0	
54				
54-58		14,3	13,5	24,4
58				
58-62	25,9	13,6	13,4	17,2
62				
62-66	22,2		11,0	15,4
66		8,9	11,8	14,5

Fortsetzung Tabelle A21:

Zeit nach letzter Arsengabe (h)	c _{As} im Kot (mg As/kg T) ⁺			
	Hammel 5	Hammel 6	Hammel 7	Hammel 8
66-72	11,6			
72			6,0	
72-78	12,5	6,2		11,7
78			7,0	
78-84	9,7	4,0		5,9
84			4,6	
84-90	6,3	3,8		5,3
90		6,3	3,2	5,7
90-96	3,8			
96		1,8	2,5	3,3
96-102	2,9			
102	3,8		2,7	3,1
102-114		1,9		
114		0,9	3,2	2,5
114-126	1,1			
126		1,5	1,3	1,7
126-138	3,2			2,1
138			1,0	1,2
138-162	0,0	0,0		
162				1,3
162-186	0,0	0,0	0,0	
186	0,0			
186-210		0,0	0,0	0,0
210				0,0
210-234	0,0	0,7	1,8	
234		0,0	0,8	
234-258	0,0			0,0
258				0,0
258-282	0,0	0,0	1,9	
282	0,0	0,0	0,0	0,0

T – Trockenmasse

⁺ bei fehlenden Arsenkonzentrationen war keine Beprobung von Kot mangels Absatz möglich

Tabelle A22: Arsenkonzentration im Serum, im Kolostrum („Ablammung“) und in der reifen Milch der Mutterschafe ($\mu\text{g As/l}$; Einzeltierdaten)

Gruppe/Tier	Serum						Milch						
	Versuchswoche						Ablammung	Probennahmetermine (im 2-wöchigen Abstand)					
	0	4	8	12	16	20		1.	2.	3.	4.	5.	
Kontrolle	1	6,5	5,3	5,6 ⁺	5,6	5,7	9,8	4,6	-	-	-	-	-
	2	5,1	5,7	6,4 ⁺	4,0	4,7	8,1	6,6	1,0	2,2	-	-	-
	3	3,4	6,6	5,4	5,6	6,2 ⁺	7,9	5,4	-	2,2	2,1	1,1	0,8
	4	4,4	8,2	7,5	5,5	6,5	-	17,2	2,3	2,7	2,0	1,0 ⁺	-
	5	5,1	5,6	6,8	4,7	6,4	10,9	8,8	-	-	<0,5	1,0	1,9
	6	5,7	8,1 ⁺	8,0	-	-	-	4,6	-	-	-	-	-
	7	4,6 ⁺	8,4	7,2	4,4	-	7,7	12,3	-	2,1	1,6	0,7	0,7
	8	4,2	9,0	8,4	3,3	5,1	8,0	8,9	2,2	1,0 ⁺	-	-	-
	9	5,0	5,9	8,8	-	-	-	6,0 ⁺	-	-	-	-	-
	10	3,9 ⁺	4,4	-	-	-	-	8,6	-	-	-	-	-
	11	5,3	4,9	7,7	5,9	5,5	-	8,4	1,7 ⁺	2,5	2,2	2,9	-
	12	4,6	5,0	7,3	5,3	6,2	8,0	13,9	-	2,8	0,7 ⁺	1,7	1,1 ⁺
MW	4,9	6,3	7,5	4,9	5,7	8,6	9,0	1,8	2,4	2,0	1,5	1,1	
s	0,8	1,6	1,0	0,9	0,7	1,2	4,0	0,7	0,3	0,3	0,9	0,7	
Arsen	1	4,1	-	35,3	-	-	-	3,6	-	-	-	-	-
	2	4,6	54,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	5,2	33,9 ⁺	45,3	33,1	-	-	10,3	-	-	-	-	-
	4	4,8	38,7	41,1	40,1	51,9	-	57,0	5,4	5,1	5,0	4,3	-
	5	4,4	40,4	42,9	33,9	55,9	-	31,6	5,0	4,3	3,7	5,2	-
	6	4,2	38,4	34,8	30,0	43,6	-	30,8	4,4	3,4	5,1	4,4	-
	7	4,2	50,8	37,5	-	-	-	5,9	-	-	-	-	-
	8	4,3	47,7	44,4	45,0	73,2	24,0	26,5	6,6	8,2	11,9	11,2	8,0
	9	-	-	36,4	36,4	62,9	19,4	31,2	-	5,3	10,4	5,9	7,0
	10	4,8	-	-	39,4	-	20,8	6,6	4,1 ⁺	-	-	-	-
	11	4,8 ⁺	53,3	38,3	27,8	59,5	20,8	45,6	5,6	5,2	2,7	9,3	7,8
	12	4,8	44,8 ⁺	42,9	27,9 ⁺	71,3	51,4	45,7	-	5,7	6,0	8,7	-
MW	4,6	46,2	39,9	35,7	59,8	27,3	26,8	5,4	5,3	6,4	7,0	7,6	
s	0,4	6,9	3,9	5,7	10,5	13,6	18,3	0,8	1,5	3,4	2,7	0,5	

⁺ Messfehler der Doppelbestimmung außerhalb der festgelegten Grenze (kein Einbezug in die Mittelwertberechnung)

Tabelle A23: Arsenkonzentration in der fettfreien Wolle und im Horn von Mutterschafen und Lämmern (mg As/kg T; Einzeltierdaten)

Gruppe/Tier		Fettfreie Wolle						Horn					
Versuchs- woche:		0	4	8	12	16	20	0	4	8	12	16	20
<i>Mutterschafe</i>													
Kontrolle	1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,2 ⁺	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	3	n.n.	n.n.	n.n.	-	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-
	5	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,3 ⁺	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	6	n.n.	n.n.	n.n.	-	-	-	n.n.	n.n.	n.n.	-	-	-
	7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	9	n.n.	n.n.	n.n.	-	-	-	n.n.	n.n.	n.n.	-	-	-
	10	n.n.	n.n.	n.n.	-	-	-	n.n.	n.n.	n.n.	-	-	-
	11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	-
	12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Arsen	1	n.n.	0,5	2,4 [°]	-	-	-	n.n.	0,8	1,3	-	-	-
	2	n.n.	0,4 ⁺	-	-	-	-	n.n.	1,9	-	-	-	-
	3	n.n.	n.n.	0,9	1,8	-	-	n.n.	1,1	0,9 ⁺	0,8 [*]	-	-
	4	n.n.	n.n.	1,3 [°]	1,7 [*]	2,3 [*]	-	n.n.	1,4 ⁺	0,9 [*]	1,5 [*]	1,8 [#]	-
	5	n.n.	n.n.	1,1	1,6	2,3 [°]	-	n.n.	0,7 ⁺	-	1,2 ⁺	2,1 ⁺	-
	6	-	0,4 ⁺	1,9	1,8	2,6	-	n.n.	1,0 ⁺	-	-	0,9 ⁺	-
	7	n.n.	0,3 ⁺	1,3 [°]	-	-	-	n.n.	1,5	1,6 [*]	-	-	-
	8	n.n.	0,3 ⁺	2,8	3,2	4,7	8,6	n.n.	2,9 [*]	2,4	1,8	2,3	3,4
	9	n.n.	0,8	2,1	2,3	2,3	3,8	n.n.	2,4	1,6	1,5	2,5	3,8
	10	n.n.	0,6 ⁺	3,0	3,6 [°]	-	-	n.n.	1,9	2,0	2,5	-	-
	11	n.n.	n.n.	0,8 [°]	1,3 [#]	1,7 [#]	1,7 [*]	n.n.	1,3	1,2	1,7	2,2 [°]	2,7
	12	n.n.	n.n.	0,8 [°]	1,6	2,1	2,4	n.n.	1,1	1,2 [*]	1,8	2,1	3,1
MW	n.n.	0,5	1,7	2,1	2,6	4,1	n.n.	1,5	1,5	1,6	2,0	3,3	
s	-	0,2	0,8	0,8	1,0	3,1	-	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	
<i>Lämmer[^]</i>													
Kontrolle	1			n.n.	-	-				-	-	-	
	2			n.n.	-	-				n.n.	-	-	
	3				n.n.	n.n.				-	n.n.	n.n.	
	4				n.n.	n.n.	-			n.n.	n.n.	-	
	5				n.n.	n.n.	-			n.n.	n.n.	-	
	6		Aufnahme von arsen-			n.n.	n.n.	Aufnahme von arsen-			-	n.n.	
	7		kontaminiertem			n.n.	0,6	kontaminiertem			n.n.	n.n.	
	8		Konzentrat:			n.n.	0,5	Konzentrat:			n.n.	0,6 ⁺	
Arsen	1				0,5 ⁺	-	-			1,5 [*]	-	-	
	2				0,4	-	-			1,7 [*]	-	-	
	3				1,0 [°]	-	-			2,9 [*]	-	-	
	4				0,3 ⁺	0,4 ⁺	-			2,2 [*]	3,6 [*]	-	
	5				0,5 ⁺	3,5 [°]	-			2,6 [*]	2,7 [*]	-	
	6				0,5 ⁺	1,7 [°]	-			2,5 [*]	3,9 [*]	-	
	7		Aufnahme von nicht-		0,7 ⁺	0,3 ⁺	0,7 ⁺	Aufnahme von nicht-		2,2 [*]	1,9 [*]	2,2 [*]	
	8		arsenkontaminiertem		-	0,4 ⁺	0,2 ⁺	arsenkontaminiertem		-	4,1 [*]	3,1 [*]	
	9		Konzentrat:		0,5 ⁺	0,3 ⁺	-	Konzentrat:		2,3 [*]	2,2 [*]	-	

n.n. – nicht nachweisbar

⁺ Messwert unterhalb der sicheren Quantifizierungsgrenze (< 40 µg As/l Aufschluss)^{*} Messwert aus wiederholt gemessenem, einzeltem Aufschluss einer Probe mit Messfehler innerhalb der festgelegten Grenze

Fortsetzung Tabelle A23:

Messwert aus wiederholt gemessenem, einzeltem Aufschluss einer Probe mit Messfehler außerhalb der festgelegten Grenze

° Messfehler der Doppelbestimmung außerhalb der festgelegten Grenze

^ keine Angabe von Mittelwerten, da die Lämmer zu den Probennahmen unterschiedlich alt waren und somit unterschiedlich viel Arsen aufnahmen

Tabelle A24: Arsenkonzentration im Serum der Lämmer ($\mu\text{g As/l}$; Einzeltierdaten) und Zeitpunkt der Schlachtung

Gruppe/Tier	Versuchswoche						Schlachtung	Zeitpunkt der Schlachtung	
	0	4	8	12	16	20			
Kontrolle*	1						3,6	Geburt	
	2						2,6	Geburt	
	3						3,4	Geburt	
	4						2,0	Geburt	
	5						3,3 ⁺	Geburt	
	6						4,8 ⁺	Geburt	
	7				n.n.	-	-	4,0	4 Wochen p.p.
	8				n.n.	-	-	4,4	4 Wochen p.p.
	9				-	5,0	5,0 ⁺	-	8 Wochen p.p.
	10				n.n.	5,1	-	4,8	8 Wochen p.p.
	11				n.n.	7,9	-	5,4	8 Wochen p.p.
	12	Aufnahme von arsen-				4,3	13,1	17,5	8 Wochen p.p.
	13	kontaminiertem				5,9	47,5	45,1	8 Wochen p.p.
	14	Konzentrat:				8,1	76,4	67,4	8 Wochen p.p.
Arsen*	1						4,8	Geburt	
	2						6,3	Geburt	
	3						5,7	Geburt	
	4						5,2	Geburt	
	5						6,7	Geburt	
	6						5,3	Geburt	
	7				5,7	4,5	-	4,5	4 Wochen p.p.
	8				4,3	-	-	-	4 Wochen p.p.
	9				3,9	-	-	5,3	4 Wochen p.p.
	10				3,6	124,5	-	44,4	8 Wochen p.p.
	11				4,3	11,2	-	52,4	8 Wochen p.p.
	12				3,7	79,7	-	39,7	8 Wochen p.p.
	13	Aufnahme von nicht-				4,6	7,4	6,8	8 Wochen p.p.
	14	arsenkontaminiertem				-	9,0	5,5	8 Wochen p.p.
	15	Konzentrat:				2,8	8,6	-	6,6

n.n. – nicht nachweisbar

⁺ Messfehler der Doppelbestimmung außerhalb der festgelegten Grenze

* keine Angabe von Mittelwerten, da die Lämmer zu den 4-wöchigen Probennahmen unterschiedlich alt waren und somit unterschiedlich viel Arsen aufnahmen

Tabelle A25: Arsenkonzentration in Niere, Leber und Muskel der Lämmer zu den Beprobungszeitpunkten (mg As/kg T; Einzeltierdaten)

Gruppe/Tier	Niere	Leber	Muskel
<i>Lämmer – Geburt</i>			
Kontrolle	1		
	2		
	3		n.n.
	4		
	5		
	6		
Arsen	1	n.n.	n.n.
	2	n.n.	n.n.
	3	n.n.	n.n.
	4	n.n.	n.n.
	5	n.n.	n.n.
	6	n.n.	n.n.
<i>Lämmer – 4 Wochen p.p.</i>			
Kontrolle	1	n.n.	n.n.
	2	n.n.	0,2 ⁺
Arsen	1		
	2		
	3		n.n.
<i>Lämmer – 8 Wochen p.p.</i>			
Kontrolle	1		
	2		n.n.
	3		
Kontrolle	1 Aufnahme von	0,6	0,2 ⁺
	2 arsen-kontamin.	1,0 [*]	0,4 ⁺
	3 Konzentrat:	1,7 [*]	0,7
Arsen	1	0,9	0,5 ⁺
	2	1,2 [#]	0,8
	3	1,0	0,4 ⁺
Arsen	1 Aufnahme von		
	2 nicht-arsen-		n.n.
	3 kontamin. Konzentrat:		

n.n. – nicht nachweisbar

⁺ Messwert unterhalb der sicheren Quantifizierungsgrenze (< 40 µg As/l Aufschluss)^{*} Messwert aus wiederholt gemessenem, einzelnen Aufschluss einer Probe mit Messfehler innerhalb der festgelegten Grenze[#] Messwert aus wiederholt gemessenem, einzelnen Aufschluss einer Probe mit Messfehler außerhalb der festgelegten Grenze

Tabelle A26: P-Werte aus dem statistischen Vergleich der Pyruvatkinaseaktivität in der Leber, in der Niere und im Muskel der 8 Wochen alten Lämmern ohne („Kontrolle“) und mit („Arsen“) Aufnahme von arsenhaltigem Konzentratfutter (n=3)

Gruppe		Kontrolle		Arsen	
		8 Wochen p.p.	8 Wochen p.p. ⁺ („cross-over“-Behandlung [*])	8 Wochen p.p.	8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung [*])
<i>Leber</i>					
Kontrolle	8 Wochen p.p.	-			
	8 Wochen p.p. ⁺ („cross-over“-Behandlung [*])	0,093	-		
Arsen	8 Wochen p.p.	0,014	0,740	-	
	8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung [*])	0,174	0,882	0,283	-
<i>Niere</i>					
Kontrolle	8 Wochen p.p.	-			
	8 Wochen p.p. ⁺ („cross-over“-Behandlung [*])	0,007	-		
Arsen	8 Wochen p.p.	0,823	0,018	-	
	8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung [*])	0,174	0,098	0,488	-
<i>Muskel</i>					
Kontrolle	8 Wochen p.p.	-			
	8 Wochen p.p. ⁺ („cross-over“-Behandlung [*])	0,451	-		
Arsen	8 Wochen p.p.	0,421	0,072	-	
	8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung [*])	0,522	0,092	0,997	-

⁺ n=2

^{*} Lämmer der Kontrollgruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. arsenkontaminiertes Konzentrat, Lämmer der Arsengruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. nicht-arsenkontaminiertes Konzentrat

Tabelle A27: P-Werte aus dem statistischen Vergleich der Glukokinaseaktivität in der Leber und der Hexokinaseaktivität in der Niere und im Muskel der 8 Wochen alten Lämmern ohne („Kontrolle“) und mit („Arsen“) Aufnahme von arsenhaltigem Konzentratfutter (n=3)

Gruppe		Kontrolle		Arsen	
		8 Wochen p.p.	8 Wochen p.p. ⁺ („cross-over“-Behandlung*)	8 Wochen p.p.	8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung*)
<i>Leber</i>					
Kontrolle	8 Wochen p.p.	-			
	8 Wochen p.p. ⁺ („cross-over“-Behandlung*)	0,800	-		
Arsen	8 Wochen p.p.	0,374	0,120	-	
	8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung*)	0,872	0,365	0,763	-
<i>Niere</i>					
Kontrolle	8 Wochen p.p.	-			
	8 Wochen p.p. ⁺ („cross-over“-Behandlung*)	0,178	-		
Arsen	8 Wochen p.p.	0,557	0,036	-	
	8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung*)	0,215	0,980	0,034	-
<i>Muskel</i>					
Kontrolle	8 Wochen p.p.	-			
	8 Wochen p.p. ⁺ („cross-over“-Behandlung*)	0,830	-		
Arsen	8 Wochen p.p.	0,843	0,444	-	
	8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung*)	0,703	0,336	0,992	-

⁺ n=2

* Lämmer der Kontrollgruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. arsenkontaminiertes Konzentrat, Lämmer der Arsengruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. nicht-arsenkontaminiertes Konzentrat

Tabelle A28: Pyruvatkinaseaktivität in der Leber der Mutterschafe und Lämmer der Kontroll- und Arsengruppe zu den verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Einzeltierdaten)

Zeitpunkt	Kontrolle	Arsen
<i>Mutterschafe</i>		
Versuchsbeginn	180	
	108	
	141	
Ablammung	128	119
	84	114
	113	130
8 Wochen p.p.	102	119
	101	107
	94	117
<i>Lämmer</i>		
Geburt (als Einzeltier)	194	142
	149	133
	144	156
Geburt (als Zwilling)	121	144
	138	130
	115	171
4 Wochen p.p.	111	171
	110	154
		159
8 Wochen p.p.	124	150
	102	149
	122	152
8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung*)	109 ⁺	144
	132	124
	150	135

⁺ mangelnde Konzentrataufnahme

* Lämmer der Kontrollgruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. arsenkontaminiertes Konzentrat, Lämmer der Arsengruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. nicht-arsenkontaminiertes Konzentrat

Tabelle A29: Pyruvatkinaseaktivität in der Niere der Mutterschafe und Lämmer der Kontroll- und Arsengruppe zu den verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Einzeltierdaten)

Zeitpunkt	Kontrolle	Arsen
<i>Mutterschafe</i>		
Versuchsbeginn		764
		675
		605
Ablammung	603	622
	460	803
	508	564
8 Wochen p.p.	672	608
	641	875
	694	715
<i>Lämmer</i>		
Geburt (als Einzeltier)	693	623
	781	927
	760	790
Geburt (als Zwilling)	1090	908
	1446	556
	1360	628
4 Wochen p.p.	987	1022
	860	949
		750
8 Wochen p.p.	683	695
	667	660
	636	760
8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung*)	858 ⁺	719
	852	798
	1020	823

⁺ mangelnde Konzentrataufnahme

* Lämmer der Kontrollgruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. arsenkontaminiertes Konzentrat, Lämmer der Arsengruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. nicht-arsenkontaminiertes Konzentrat

Tabelle A30: Pyruvatkinaseaktivität im Muskel der Mutterschafe und Lämmer der Kontroll- und Arsengruppe zu den verschiedenen Beprobungszeitpunkten (U/mg Protein; Einzeltierdaten)

Zeitpunkt	Kontrolle	Arsen
<i>Mutterschafe</i>		
Versuchsbeginn	4,3	
	5,9	
	4,9	
Ablammung	3,1	6,6
	3,3	8,5
	6,8	4,4
8 Wochen p.p.	7,0	6,5
	4,3	5,0
	4,1	4,9
<i>Lämmer</i>		
Geburt (als Einzeltier)	2,6	2,7
	3,5	4,2
	3,9	2,1
Geburt (als Zwilling)	4,2	1,8
	3,7	1,7
	4,4	3,9
4 Wochen p.p.	4,7	7,7
	5,2	7,9
		5,0
8 Wochen p.p.	4,5	5,2
	5,3	3,1
	4,8	3,8
8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung*)	3,5 ⁺	4,8
	6,5	5,0
	6,5	2,8

⁺ mangelnde Konzentrataufnahme

* Lämmer der Kontrollgruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. arsenkontaminiertes Konzentrat, Lämmer der Arsengruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. nicht-arsenkontaminiertes Konzentrat

Tabelle A31: Glukokinaseaktivität in der Leber der Mutterschafe und Lämmer der Kontroll- und Arsengruppe zu den verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Einzeltierdaten)

Zeitpunkt	Kontrolle	Arsen
<i>Mutterschafe</i>		
Versuchsbeginn		12,4 12,5 15,8
Ablammung	11,4 3,0 3,5	8,9 5,0 7,6
8 Wochen p.p.	8,4 16,1 5,9	19,1 12,5 16,7
<i>Lämmer</i>		
Geburt (als Einzeltier)	16,2 27,8 31,3	21,8 25,7 20,9
Geburt (als Zwilling)	28,9 32,9 32,0	27,9 15,3 25,0
4 Wochen p.p.	18,7 14,5	7,6 24,0 10,7
8 Wochen p.p.	9,5 8,9 10,3	9,7 22,3 13,8
8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung*)	10,9 ⁺ 6,6 4,6	12,2 8,2 15,7

⁺ mangelnde Konzentrataufnahme

* Lämmer der Kontrollgruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. arsenkontaminiertes Konzentrat, Lämmer der Arsengruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. nicht-arsenkontaminiertes Konzentrat

Tabelle A32: Hexokinaseaktivität in der Niere der Mutterschafe und Lämmer der Kontroll- und Arsengruppe zu den verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Einzeltierdaten)

Zeitpunkt	Kontrolle	Arsen
<i>Mutterschafe</i>		
Versuchsbeginn	13,6 12,5 13,3	
Ablammung	6,2 6,7 8,2	9,2 7,9 9,7
8 Wochen p.p.	10,9 11,3 11,5	12,5 14,3 14,1
<i>Lämmer</i>		
Geburt (als Einzeltier)	9,5 6,7 10,6	9,0 9,7 10,2
Geburt (als Zwilling)	11,8 14,1 12,1	8,5 11,5 7,4
4 Wochen p.p.	11,2 9,2	10,9 9,8 10,1
8 Wochen p.p.	9,5 11,4 11,6	10,0 8,9 9,0
8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung*)	17,9 ⁺ 12,7 14,7	11,3 15,1 13,3

⁺ mangelnde Konzentrataufnahme

* Lämmer der Kontrollgruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. arsenkontaminiertes Konzentrat, Lämmer der Arsengruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. nicht-arsenkontaminiertes Konzentrat

Tabelle A33: Hexokinaseaktivität im Muskel der Mutterschafe und Lämmer der Kontroll- und Arsengruppe zu den verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mU/mg Protein; Einzeltierdaten)

Zeitpunkt	Kontrolle	Arsen
<i>Mutterschafe</i>		
Versuchsbeginn	48,4	
	50,6	
	30,4	
Ablammung	7,2	72,9
	16,4	24,9
	29,8	37,8
8 Wochen p.p.	46,1	19,6
	75,1	42,3
	39,7	55,5
<i>Lämmer</i>		
Geburt (als Einzeltier)	32,5	44,9
	16,9	60,4
	64,3	30,0
Geburt (als Zwilling)	66,6	13,7
	16,4	51,9
	32,5	38,6
4 Wochen p.p.	46,0	110,4
	30,4	80,2
		83,7
8 Wochen p.p.	38,1	23,6
	60,2	63,4
	82,9	42,6
8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung*)	46,0 ⁺	47,1
	109,5	11,0
	50,9	54,4

⁺ mangelnde Konzentrataufnahme

* Lämmer der Kontrollgruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. arsenkontaminiertes Konzentrat, Lämmer der Arsengruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. nicht-arsenkontaminiertes Konzentrat

Tabelle A34: Proteingehalt in der Leber von Mutterschafen und Lämmern der Kontroll- und Arsengruppe zu den verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mg Protein/g FM; Mittelwert und Standardabweichung; n=3)

Zeitpunkt	Kontrolle	Arsen
<i>Mutterschafe</i>		
Versuchsbeginn	174,5 8,4	
Ablammung	170,5 14,2	177,5 10,7
8 Wochen p.p.	176,9 14,3	173,6 11,4
<i>Lämmer</i>		
Geburt (als Zwilling)	148,8 16,8	139,6 11,9
Geburt (als Einzeltier)	145,0 0,8	145,2 10,9
Geburt (alle; n=6)	146,9 10,8	142,4 10,6
4 Wochen p.p.	167,3 ⁺	154,3 4,2
8 Wochen p.p.	163,5 12,5	156,9 7,6
8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung [*])	165,8 ⁺	170,3 17,2

⁺ n=2, daher Angabe einer Standardabweichung nicht möglich

^{*} Lämmer der Kontrollgruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. arsenkontaminiertes Konzentrat, Lämmer der Arsengruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. nicht-arsenkontaminiertes Konzentrat

Tabelle A35: Proteingehalt in der Niere von Mutterschafen und Lämmern der Kontroll- und Arsengruppe zu den verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mg Protein/g FM; Mittelwert und Standardabweichung; n=3)

Zeitpunkt	Kontrolle	Arsen
<i>Mutterschafe</i>		
Versuchsbeginn	131,3 4,4	
Ablammung	117,8 5,5	127,0 5,4
8 Wochen p.p.	119,3 6,4	122,6 7,8
<i>Lämmer</i>		
Geburt (als Zwillings)	113,8 10,9	109,2 6,8
Geburt (als Einzeltier)	106,4 6,2	119,1 ⁺
Geburt (alle; n=6)	110,1 8,9	113,2 7,3
4 Wochen p.p.	133,5 ⁺	122,3 12,2
8 Wochen p.p.	120,8 4,5	114,9 7,0
8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung*)	118,1 ⁺	116,0 13,5

⁺ n=2, daher Angabe einer Standardabweichung nicht möglich

* Lämmer der Kontrollgruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. arsenkontaminiertes Konzentrat, Lämmer der Arsengruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. nicht-arsenkontaminiertes Konzentrat

Tabelle A36: Proteingehalt im Muskel von Mutterschafen und Lämmern der Kontroll- und Arsengruppe zu den verschiedenen Beprobungszeitpunkten (mg Protein/g FM; Mittelwert und Standardabweichung; n=3)

Zeitpunkt	Kontrolle	Arsen
<i>Mutterschafe</i>		
Versuchsbeginn	146,3 5,0	
Ablammung	142,1 8,2	152,6 12,3
8 Wochen p.p.	144,4 6,3	155,8 16,4
<i>Lämmer</i>		
Geburt (als Zwilling)	134,6 2,0	130,6 12,3
Geburt (als Einzeltier)	142,2 5,7	131,6 12,0
Geburt (alle; n=6)	138,4 5,6	131,1 10,9
4 Wochen p.p.	158,9 ⁺	139,5 6,6
8 Wochen p.p.	153,8 5,2	147,4 10,3
8 Wochen p.p. („cross-over“-Behandlung [*])	150,5 ⁺	144,9 6,1

⁺ n=2, daher Angabe einer Standardabweichung nicht möglich

^{*} Lämmer der Kontrollgruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. arsenkontaminiertes Konzentrat, Lämmer der Arsengruppe erhielten von Woche 5 bis 8 p.p. nicht-arsenkontaminiertes Konzentrat

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt wurde. Mit dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden bisher noch keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen.

Desweiteren erkläre ich, dass keine Strafverfahren gegen mich anhängig sind.

Halle/Saale, den 1.12.2009

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Ricarda Krüger
geboren am	10.07.1981 in Blankenburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

SCHULBILDUNG

1988 – 1991	Polytechnische Oberschule „Käthe Kollwitz“ in Thale
1991 – 1992	Grundschule „Geschwister Scholl“ in Thale
1992 – 2000	Europagymnasium „Richard von Weizsäcker“ in Thale
07.07.2000	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

STUDIUM

seit 01.10.2000	Studium der Ernährungswissenschaften an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
10.2004 – 11.2005	Diplomarbeit mit dem Thema: „Fettsäuren und weitere Qualitätskriterien von Schlachtschweinen und einem Wurstsortiment in Thüringen und Vorschläge zur Optimierung“
03.01.2006	Abschluss des Studiums als Diplom-Trophologin
07.2006 – 06.2009	Promotionsstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Professur für Tierernährung
08. – 09.2009	Hilfswissenschaftler am Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
09.2009 – 04.2010	Versuchstechniker bei der Firma „feedtest“ (06193 Nauendorf)
seit 05.2010	Postdoc am Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) in Dummerstorf

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotionszeit begleitet, mir stets mit Rat und Tat beiseite gestanden und somit zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Rodehutsord danke ich sehr für das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Bereitstellung dieses fachübergreifenden Themas, für die Kooperation mit der Landesanstalt für landwirtschaftliche Chemie (LA Chemie) in Hohenheim, sowie für die Betreuung und Unterstützung während meiner gesamten Promotionszeit.

Ebenso bedanke ich mich nochmals ganz herzlich bei der Wilhelm-Schaumann-Stiftung für das bereitgestellte Stipendium, welches es mir erst ermöglichte, dieses Promotionsstudium aufzunehmen.

Bedanken möchte ich mich auch beim Sächsischen Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie für die finanzielle Unterstützung bei der Durchführung dieses Kooperationsprojektes.

Ein großes Dankeschön für die geduldige Einarbeitung, sowie für die Hilfestellung bei der Durchführung meiner Versuche gilt Frau Dr. Jeannette Boguhn. Für ihre stete Diskussionsbereitschaft, die konstruktive Hilfe bei sämtlichen Problemen und Fragestellungen und für die manchmal notwendigen motivierenden Worte möchte ich mich hiermit ganz herzlich bedanken.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Michael Bulang für seine Hilfe und Unterstützung bei statistischen und fachlichen Fragen, für die vielfältigen Diskussionen und die ansteckende, anhaltend optimistische und begeisterte Einstellung gegenüber Wissenschaft und Forschung auch bei unbefriedigenden Ergebnissen!

Auch bei Herrn Dr. Holger Kluth möchte ich mich für seine Bereitschaft, besonders in den letzten Monaten, bedanken, sich stets für die Besprechung meiner Fragen und Anliegen Zeit genommen zu haben und dafür, dass die Lösung von Problemen immer auf ganz unkompliziertem Wege verlief.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Frank Hirche, der mir stets (und ausdauernd!) bei vielfältigen theoretischen und praktischen Fragestellungen in der Laborarbeit behilflich war. Auch für die hilfreiche Kritik und die fachübergreifenden Diskussionen bedanke ich mich ganz herzlich.

Meinem ehemaligen Bürokollegen Basti danke ich für die schöne, gemeinsame Zeit im Büro. Ihm, sowie auch allen ehemaligen Doktoranden der Tierernährung, Maren, Christian, Tina, Linda und Reza möchte ich ebenfalls für die nette Hilfsbereitschaft bei Problemen und Diskussionsbedarf danken!

Für die kollegiale und freundliche Zusammenarbeit, sowie die konsequente Unterstützung bei sämtlichen Versuchen im Nutztierwissenschaftlichen Zentrum in Merbitz möchte ich mich besonders bei Herrn Olaf Hödel, Herrn Detlef Barth, Herrn Dr. Woitow und Herrn Volker Kutzner bedanken, ohne deren Hilfe ein reibungsloser Versuchsablauf nicht möglich gewesen wäre.

Ein weiteres großes Dankeschön für die Durchführung sämtlicher Analysen, sowie für die freundliche Anleitung und Hilfestellung bei der Arbeit im Labor gilt Frau Schmidt, Frau Rapp, Frau Günther und Herrn Nico Markus. Vielen Dank dafür!

Auch bei Herrn Dr. Christian Elwert möchte ich mich für die anregenden Diskussionen und die hilfreiche Kritik bedanken!

Herrn Prof. Dr. Eder danke ich für die Nutzung der Laborräume am Institut für Ernährungswissenschaften. Frau Isaak, Frau Kaiser, Frau Schibelius und den Doktoranden dieses Institutes danke ich für die freundliche Unterstützung während meiner dortigen Arbeiten!

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Schenkel bedanken, der es mir ermöglichte, einige Arbeiten an der LA Chemie in Hohenheim durchzuführen. Herrn Dr. Breuer und Herrn Bandel danke ich für die aufopfernde theoretische und praktische Unterstützung.

Liebe Familie, lieber Ronny, liebe Freunde, liebe „übliche Verdächtige“! Euch möchte ich ganz herzlich dafür danken, dass ihr immer für mich da wart und mir jegliche Unterstützung gegeben habt, die ich benötigt habe, und für die angenehme Ablenkung und jede Menge Spaß während meiner Promotionszeit hier in Halle.