



Neue Antibiotika in der Umwelt – Erste Ergebnisse zur ökotoxischen Wirkung im Wasserkreislauf

Jan Brünsing (jbruensing@ukaachen.de), Wolfgang Dott (wolfgang.dott@post.rwth-aachen.de), Institut für Hygiene und Umweltmedizin, RWTH Aachen; Henner Hollert (henner.hollert@bio5.rwth-aachen.de), Institut für Umweltforschung, RWTH Aachen; Jana Bressling (bressling@isa.rwth-aachen.de), Institut für Siedlungswasserwirtschaft, RWTH Aachen

Zusammenfassung

Die Zunahme komplizierter Infektionen durch multi-resistente Bakterien ist ein bekanntes Problem in der Medizin und hat auch ökonomische Bedeutung. Die Folgen für die Umwelt sind bisher allerdings kaum bekannt: Durch die starke Inzidenzzunahme von schweren Infektionen mit multiresistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) und gramnegativen Bakterien mit Extended-spectrum Beta-Lactamase (ESBL) sind ältere Antibiotika oft nicht mehr geeignete Therapeutika. Diese ökotoxikologisch oft gut bekannten Substanzen werden durch neue Wirkstoffe wie Daptomycin, Tigecyclin und Linezolid abgelöst. Weitere Antibiotika mit breitem Spektrum oder für spezielle Indikationen wie Piperacillin, Doripenem und Rifaximin werden immer bedeutender. Der Einfluss dieser neuen Substanzen auf die aquatische Umwelt ist jedoch völlig unbekannt, obwohl deren Gebrauch in den kommenden Jahrzehnten erheblich steigen könnte.

Erste ökotoxikologische Untersuchungen zeigen, dass auch diese neuen Substanzen ähnliche Effektdosen besitzen, die auch schon für Arzneistoffe ermittelt wurden, denen eine Umweltrelevanz zugesprochen wird.

Potentielle Mikroschadstoffe sollten schon frühzeitig bei Marktzulassung auf ihre Wirkungen untersucht werden, nicht erst wenn erste Nachweise in Gewässern gelungen sind.

1 Einleitung

1.1 Wandel der Therapie-Regime

In allen Bereichen der modernen Medizin haben sich viele Therapie-Regime in den letzten Jahren erheblich verändert. Die Umweltwissenschaften scheinen diesen veränderten Trends teilweise erst zu spät zu folgen: Beta-Blocker der frühen 1980er wiederholt in umweltanalytischen und ökotoxikologischen Studien zu evaluieren bringt keinen Vorteil, wenn neue Patienten heute gemäß der aktuellen Leitlinien mit ACE-Inhibitoren, AT1- oder Calciumantagonisten behandelt werden (Aktorius, 2009).

Um dem möglichen Wandel der antibiotischen Therapie von schweren und multiresistenten bakteriellen Infektionen einen Schritt voraus zu sein, wurden für diese Arbeit gezielt Antibiotika ausgewählt, die zwar aktuell aufgrund eines geringen Verbrauchs keine Umweltrelevanz haben, diese aber bei weiter zunehmender Resistenz-Problematik durchaus erlangen könnten.

1.2 Anstieg und Veränderungen des Antibiotika-Gebrauchs

Bereits seit 1975 erfasst die Arbeitsgemeinschaft „Empfindlichkeitsprüfungen und Resistenz“ der Paul-Ehrlich-Gemeinschaft (PEG) die Resistenzlage der bekannten klinisch bedeutsamen Bakterienarten wie Enterobacteriaceae, Staphylokokken und Enterokokken in Mitteleuropa. Im November 2001 wurden in den beteiligten Laboren mit gleichen Methoden die Bakterien identifiziert und mittels Mikrodilution nach DIN auf Empfindlichkeit gegenüber den klinisch wichtigen Antibiotika getestet (Kresken et al., 2001). Verglichen mit den Ergebnissen von 1998 fand sich erneut eine weitere erhebliche Zunahme der Resistenz gegenüber Antibiotika. Gegenüber dem Fluorchinolon Cirpofloxacin hat sich die Zahl der resistenten Proben von 7,7% auf 14,5% fast verdoppelt, *Staphylococcus aureus* ist nunmehr zu 22,7% resistent (1998: 14,7%). Der Anstieg von MRSA von 15,2% (1998) auf 20,7% wurde schon im Jahr 2001 als kritisch bewertet (Kresken, 2000; Kresken et al., 2001).

Als scheinbare „Antwort“ auf die stetig steigende Rate von komplizierten, oft multi-resistenten Infektionen ist eine deutliche Zunahme des Antibiotika-Verbrauchs vielfach beschrieben worden (Abb. 1).

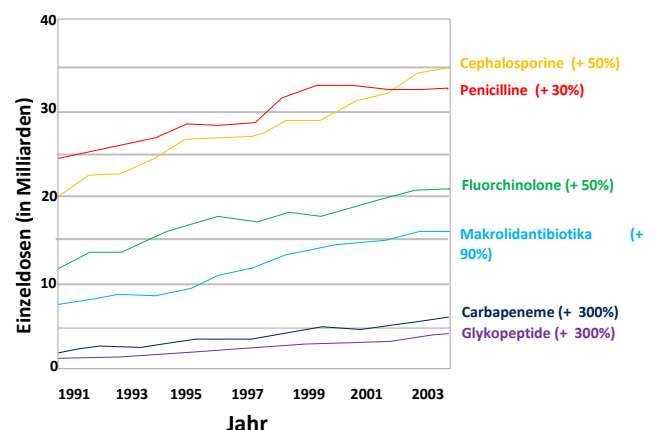


Abb. 1: Steigender Verbrauch der wichtigsten Wirkstoffklassen der Antibiotika zwischen 1991 und 2003 (nach: PEG, 2005)

Nicht nur im Aspekt einer nachhaltigen Krankenbehandlung sondern vielmehr auch aus ökonomischen Gesichtspunkten wird immer wieder die Frage gestellt in wie weit sich die Erkrankungszahlen in Zukunft ändern werden, insbesondere wenn Faktoren wie der demographische Wandel, die Zunahme von chronischen Leiden und Multimorbidität bei immer

besserer Therapie in diese Rechnung einbezogen werden. Bis zur Mitte des aktuellen Jahrhunderts wird zwar die Bevölkerung im Vergleich zum Jahr 2005 um 16,6% auf etwa 68,7 Millionen Einwohner sinken, jedoch wird der Anteil von alten und sehr alten Menschen weiter steigen.

Mit steigender Lebenserwartung steigt gleichermaßen auch der Anteil an Jahren mit physischen Beeinträchtigungen. (Doblhammer&Kytir, 1997; Jagger et al., 2009). Jeder fünfte Patient zwischen 60 und 80 Jahren hat schon in der heutigen Zeit mehr als fünf Hauptdiagnosen in seiner Karteikarte (Wiesner & Bittner, 2005). Die in den Studien untersuchten Erkrankungen wie Demenz, Diabetes oder der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung durch Rauchen (COPD) sind natürlich nicht mit Antibiotika ursächlich behandelbar – vielmehr erhöhen diese Grunderkrankungen das Risiko für bakterielle Infektionen, die dann wiederum mit Antibiosen abgedeckt werden müssen.

Dem Trend zu neuen Antibiotika und dem Trend zur Eskalation der antibiotischen Therapie generell soll Rechnung getragen werden, in dem hier die im Folgenden vorgestellten hochpotenten Substanzen ökotoxikologisch untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Ausgewählte antibakterielle Wirkstoffe

Das im April 2006 in Deutschland erstmalig zugelassene **Daptomycin** (Cubicin®) ist der erste Vertreter der neuen Wirkstoffklasse der zyklischen Lipopetide (ZCT, 2006a). Die Anwendung von Daptomycin ist in Deutschland für die Behandlung Erwachsener mit komplizierten Haut- und Weichteilinfektionen angezeigt (Novartis, 2011). Daptomycin ist der derzeit stärkste bakterizide Wirkstoff in der Humanmedizin. Daptomycin wird in Deutschland in zwei Dosierungsgrößen von 350 und 500 mg Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung angeboten.

Tigecyclin (Tygacil®) ist ein Glycylcyclin, ein chemisch verändertes Derivat der Tetracycline, das jedoch auch gegen die typischerweise Tetracyclin-unempfindlichen Bakterien wirksam ist (ZCT, 2006b). Patienten erhalten 100 mg Tigecyclin am Tag über einen venösen Zugang.

Als synthetischer Wirkstoff ist es der erste Vertreter der neuen Wirkstoffklasse der Oxazolidinone (ZCT, 2001) das **Linezolid** (Zyvoxid®) für diese Studie ausgesucht worden. Auch Linezolid wird zweimal täglich intravenös verabreicht (2x 600 mg/die).

Neben den drei typischen Reserve-Antibiotika sind weiterhin das Acylureidopenicillin **Piperacillin** (Tazobac® u.a.) und das Carbapenem **Doripenem** (Doribax®) ausgewählt worden. Piperacillin ist schon mehrere Jahre auf dem Markt, kommt aber in fester Kombination mit Tazobactam heute immer häufiger zum Einsatz. Carbapenem haben ein besonders breites Spektrum und werden aufgrund ihrer Wirksamkeit gegen *Pseudomonasaeruginosa* immer öfter appliziert.

2.2 Ökotoxikologische Untersuchungen

Die Medikamente wurden über die Krankenhausapotheke des Universitätsklinikums Aachen beschafft und immer nach Vorgaben der Hersteller zubereitet, als wenn sie für die Infusion bestimmt gewesen wären. Es wurden Stammlösungen hergestellt, von denen für die einzelnen Anwendungen und Teste entsprechende Spike entnommen werden konnten. Für alle Verwendungen wurden die Stammlösungen maximal 1 Tag im Kühlschrank bei 4°C gelagert, danach verworfen und nach identischem Schema frisch hergestellt.

2.2.1 Algenwachstums-Hemmtest mit *Desmodesmus-subspicatus*

Der Algentoxizitätstest wird abweichend von der Norm (DIN 38412-33, 1991, DIN EN ISO 8692, 2010) in 24 Well Mikrotiterplatten durchgeführt. Testorganismus ist die einzellige Grünalge *Desmodesmus-subspicatus* CHODAT in Form einer exponentiell wachsenden Kultur. Jede Verdünnung der eingesetzten Antibiotika-Stammlösung, jede Kontrolle und jeder Leerwert wird in 3 Parallelen bestimmt.

2.2.2 Daphnien-Immobilisationstest

Der Daphnientest wird nach DIN 34812-30 (1989) und DIN EN ISO 6341 (2010) durchgeführt. Für diesen Toxizitätstest werden Süßwasserkrebse der Art *Daphnia magna* STRAUS eingesetzt, die aus einer drei bis vier Wochen alten Zucht stammen. Als Maß für die Toxizität der Antibiotika gilt die Schwimmfähigkeit der Testtiere nach 24 h Exposition. Vor und nach dem Test werden der pH-Wert und die Leitfähigkeit bestimmt. Pro Ansatz werden 4 Parallelen mit jeweils 5 Tieren für jede Verdünnungsstufe der eingesetzten Antibiotika-Stammlösung sowie für die Kontrolle eingesetzt.

2.2.3 Lumineszenz-Hemmtest mit *Vibriofischeri*

Im Leuchtbakterientest wird die Hemmung der Lichtemission des lumineszierenden Bakteriums *Vibrio fischeri* durch die eingesetzten Antibiotika nach DIN EN ISO 11348-1 (1999) bestimmt. Es werden frisch gezüchtete und in Schutzmedium konservierte Bakterien verwendet. Maßgebliches Testkriterium ist die Abnahme der Lumineszenz nach einer Expositionsdauer von 30 min.

2.2.4 Fischeitest mit *Daniorerio*

Der Fischeitest nach DIN 38415-6 (2001) und ISO 15088 (2007) ermöglicht eine Aussage über die subchronische Toxizität der eingesetzten Antibiotika auf Sekundärkonsumenten. Als Testmaterial dienen Eier des Zebra-bärblings (*Daniorerio* Hamilton-Buchanan). Nach einer Expositionszeit von 48 h gelten als Schädigung der Tod der Embryonen, sowie definierte Störungen der Embryonalentwicklung, die zum Tod führen.

2.2.5 Statistische Auswertung

Die Hemmwerte werden in den Tests nach dem jeweiligen Standardverfahren bestimmt. Aus den erhaltenen sigmoidalen Dosis-Wirkungsbeziehungen im Algen-, Daphnien- und Leuchtbakterientest werden EC₅₀ Werte mit Probitanalyse berechnet. Die gewonnenen Rohdaten im Fischeitstest werden als LC₅₀-Werte mit variabler Steigung bestimmt.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der ökotoxikologischen Untersuchungen sind als EC₅₀- bzw. LC₅₀-Werte in Form eines Balkendiagramms dargestellt (Abb. 2). Ein Wirkstoff ist dabei umso toxischer, je kleiner der EC₅₀- bzw. LC₅₀-Wert für den jeweiligen Biotest ist. Wird für die untersuchten Antibiotika keine Hemmung und somit keine ökotoxische Wirkung ermittelt, liegen die EC/LC₅₀-Werte oberhalb der maximal einsetzbaren Konzentration in den jeweiligen Biotests.

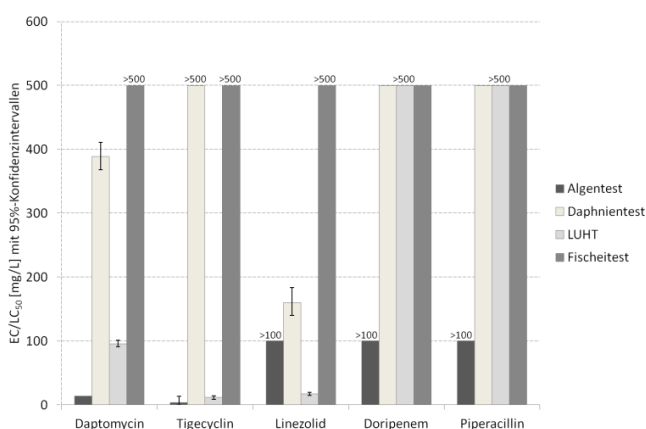


Abb. 2: EC/LC₅₀-Werte [mg/L] mit 95%-Konfidenz-Intervallen der untersuchten Antibiotika-Stammlösungen in den aquatischen Ökotoxizitätstests

4 Schlussfolgerungen

Im Hinblick, dass die modernen Antibiotika zumindest aktuell hauptsächlich in Industrieländern zum Einsatz kommen, ist davon auszugehen, dass die meisten Ausscheidungen der damit behandelten Patienten in kommunalen Kläranlagen behandelt werden. Die ökotoxikologischen Untersuchungen wurden mit den Ausgangssubstanzen durchgeführt, da mit Ausnahme des Linezolid immer der größere Teil nicht metabolisiert vom Patienten ausgeschieden wird. Alle getesteten Antibiotika zeigten in mindestens einem Biotest eine relevante Wirkung in Konzentrationsbereichen, in denen auch gängige, bereits als umweltrelevant eingestufte Arzneistoffe Effekte gezeigt haben.

Zur Entwicklung der Inzidenz von bakteriellen Infektionen ist festzuhalten, dass die Zahl älterer Menschen zunehmen wird, die vor allem auch mit der einhergehenden Multimorbidität eine erhöhte Empfänglichkeit für bakterielle Infektionen und Hospitalisation haben. Weiterhin ist der Trend der stetigen Zunahme der multiresistenten Infektionen in Deutschland bisher ungebrochen. Es ist daher durchaus wahrscheinlich, dass die aktuellen Reserve-Antibiotika und

Wirkstoffe mit besonders potentem und breitem Wirkspektrum im Verbrauch steigen werden.

Die neuen Substanzen sollten schon jetzt genau beobachtet werden, und nicht erst dann in ein Umwelt-Monitoring einbezogen werden, wenn erste Nachweise in Grund- und Oberflächengewässern gelungen sind.

Untersuchungen zur biologischen Abbaubarkeit sowie genotoxikologische Untersuchungen laufen zurzeit. Weiterhin werden die Effekte und die Effizienz erweiterter Oxidationsverfahren (AOP) für die Entfernung der Antibiotika aus Kläranlagen-Nachläufen aktuell untersucht.

Literatur

Aktorius, K., Förstermann, U., Hofmann, B.F., Starke, K. (2009). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Elsevier.

DIN 34812-30 (1989):Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L), Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Daphnien über Verdünnungsstufen (L 30). Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH, Berlin

DIN 38412-33(1991): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (L 33). Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH, Berlin

DIN 38415-6 (2001):Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Suborganismische Testverfahren (Gruppe T), Teil 6: Giftigkeit gegenüber Fischen, Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser auf die Entwicklung von Fischeiern über Verdünnungsstufen (T 6). Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH, Berlin

DIN EN ISO 6341 (2010): Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der Hemmung der Beweglichkeit von Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) - Akuter Toxizitäts-Test (ISO/DIS 6341:2010); Deutsche Fassung prEN ISO 6341:2010. Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH, Berlin

DIN EN ISO 8692 (2010):Wasserbeschaffenheit - Süßwasser-algen-Wachstumshemmtest mit einzelligen Grünalgen (ISO/DIS 8692:2010); Deutsche Fassung prEN ISO 8692:2010. Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH, Berlin

DIN EN ISO 11348-1 (1999):Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest) - Teil 1: Verfahren mit frisch gezüchteten Bakterien. Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH, Berlin

Doblhammer, G., & Kytir, J. (1997). „Kompression“ oder „Expansion“ der Morbidität? Trends in der Lebenserwartung älterer Menschen in guter Gesundheit 1978 bis 1998. Demographische Informationen, 71-79.

ISO 15088 (2007):Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (Daniorerio). International Organization for Standardization, Genf, Switzerland

Jagger, C., Gillies, C., Moscone, F., Cambois, E., Van Oyen, H., Nusselder, W., &Robine, J. M. (2009). Inequalities in healthy life years in the 25 countries of the European Union in 2005: a cross-national meta-regression analysis. *The Lancet*, 372(9656), 2124-2131.

Kresken, M., Hafner, D., Schmitz, F. J., & Wichelhaus, T. (2001). PEG-Resistenzstudie. Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie eV.

Kresken, M. (2000). Zeitliche Entwicklung der Chinolon-Resistenz bei klinisch wichtigen Bakterienspezies in Mitteleuropa - Ergebnisse der PEG Resistenzstudie -. [Powerpoint Presentation, online available] Retrieved from www-public.rz.uni-duesseldorf.de/~hafner/Chinolone_Homepage.ppt

Kresken, M., & Hafner, D. (2001). Resistenzsituation gegenüberChinolonen. *Pharmazie in unserer Zeit*, 30(5), 436-445.

Novartis. (2011). Fachinformation Cubicin (Daptomycin). Nürnberg: Novartis Pharma.

Pfizer (Hersteller). (2010). Zyvoxid® - Referenten Slide Kit 2012 [Präsentation]

Wiesner, G., & Bittner, E. (2005). Zur Inzidenz und Prävalenz von Mehrfachkrankheiten in Deutschland. *ArbeitsmedSozialmedUmweltmed*, 40(9), 490-498.

ZCT. (2001). Linezolid - erstes Antiinfektivum aus der Klasse der Oxazolidinone. *Zeitschrift für Chemotherapie*, 6.

ZCT. (2006a). Daptomycin - eine neue Therapieoption bei Infektionen mit grampositiven (Problem-) Keimen. *Zeitschrift für Chemotherapie*, 4.

ZCT. (2006b). Tigecyclin - ein neues Antibiotikum zur parenteralen Therapie. *Zeitschrift für Chemotherapie*, 3.

Korrespondenzadresse

Cand.med. Jan Brünsing, Dipl.-Geol.
Universitätsklinikum Aachen (RWTH Aachen)
Institut für Hygiene und Umweltmedizin
Pauwelsstrasse 30, D-52074 Aachen
Tel.: 0241 / 80 88 206
Email: jbruensing@ukaachen.de

A new method to determine the anaerobic degradability of surfactants: the AnBUSDiC test

Thomas Bendt and Andreas Willing

[Environmental Sciences Europe 2012, 24:38](#)
[doi:10.1186/2190-4715-24-38](https://doi.org/10.1186/2190-4715-24-38)

Published: 29 November 2012

Abstract (provisional)

Background.

Surfactants are chemicals with a high production volume and a wide dispersive use, i.e. surfactants have a high environmental impact. Most commercial surfactants are aero-bically biodegradable. Only a small fraction of the surfactants is not aerobically broken down during the usual hydraulic retention times of modern WWTPs. This fraction, due to the predominantly hydrophobic nature of surfactants, adheres to the sludge. The sludge is usually collected and further treated under anaerobic conditions in digester tanks. Therefore, the knowledge about anaerobic biodegradability under digester tank conditions is important to gain an understanding about the environmental fate of surfactants.

Results.

A new test method suited for the assessment of the anaerobic bio-degradability of surfactant under sewage plant simulation conditions is proposed. The test method foresees that an accurately known amount of the test substance is added to the sludge inoculum, and that the test substance is added in two sequential steps to overcome possible interferences from unspecific digester gas formation caused by the surface-activity of the surfactant test substance. By measuring the difference in the gas volumes produced in the sludge inoculum plus test substance and the corresponding control (sludge inoculum only) and converting the gas volumes to the percentage degree of biodegradation, this test allows the quantification of the anaerobic biodegradability of the test substance.

Conclusions

Tests with commercial surfactants indicate that the newly developed test method allows for a quantification of the degradation of surfactants under conditions encountered in the anaerobic digester tank of municipal waste water treatment plants. The described test is particularly suitable for the testing of surfactants, because the two-step design overcomes any problems related to unspecific digester gas formation caused by the surface-activity of the test substances, therefore avoiding false positive results.