



Bestimmung häufig verschriebener Antibiotika in verschiedenen Stadien und Medien im urbanen Abwassersystem mittels Ultraschallextraktion (USE) und SPE sowie LC-MS/MS

Sara Schubert¹ (sara.schubert@tu-dresden.de),

Thomas Käseberg² (thomas.kaeseberg@tu-dresden.de), Jakob Benisch²

(jakob.benisch@mailbox.tu-dresden.de), Holger Knoth³ (holger.knoth@uniklinikum-dresden.de),

Reinhard Oertel¹ (reinhard.oertel@tu-dresden.de), Joachim Fauler^{1,4} (joachim.fauler@tu-dresden.de)

¹ Technische Universität Dresden, Institut für Klinische Pharmakologie,

² Technische Universität Dresden, Institut für Siedlungs- und Industrierwasserwirtschaft

³ Universitätsklinikum Carl Gustav Carus Dresden, Klinikapotheke

⁴ Forschungsverbund Public Health Sachsen und Sachsen-Anhalt

Zusammenfassung

Zur Bestimmung der am häufigsten verschriebenen Antibiotika im urbanen Abwassersystem wurden diverse Abwässer, Oberflächenwasser, Biofilme sowie Sedimente und Klärschlämme mittels Ultraschallextraktion (USE) und SPE sowie LC-MS/MS untersucht. Fluorchinolone, Makrolide sowie Doxycyclin zeigten eine hohe Stabilität entlang des Abwassersystems und in der Kläranlage und haben folglich ein langfristig erhöhtes Eintragspotenzial in die Umwelt. Für die im ambulanten und stationären Bereich verstärkt eingesetzten Beta-Laktame konnte dagegen kaum ein erhöhter Eintrag über die Kläranlage nachgewiesen werden.

Die Bewertung von Verschreibungsdaten kann zu einer deutlichen Über- bzw. Unterschätzung des Antibiotikaeintrages führen und die Berücksichtigung weiterer substanzspezifische Faktoren (z.B. Exkretion und Saisonalität) ist nötig.

Einleitung

Der begrenzter Abbau von Arzneistoffen in Kläranlagen (KA) führt über deren Abläufe zum Eintrag in die Umwelt (Brooks and Huggett 2012). Antibiotika, selbst in geringen Konzentrationen, können (Multi-)Resistenzen in Mensch und Tier induzieren sowie die aquatische und terrestrische Umwelt beeinflussen (Kümmerer 2009a). Im Abwassersystem können Antibiotika, z. B. Vertreter der Fluorchinolone, Tetracycline und Sulfonamide, an Feststoffe adsorbieren (Lillenberg et al. 2009, Pamreddy et al. 2013) und so zu einem längeren Verbleib in der Umwelt führen.

Im Projekt ANTI-Resist wurden die am häufigsten verschriebenen Antibiotika im Abwassersystem der Stadt Dresden untersucht. Neben diesen ambulant verordneten Antibiotika (Makrolide: Azithromycin, Clarithromycin und Roxithromycin, Fluorchinolone: Cipro- und Levofloxacin (Ofloxacin), Beta-Laktame: Amoxicillin, Cefuroxim und Penicillin V, weitere: Clindamycin, Doxycyclin, Sulfamethoxazol und Trimethoprim) wurde das Spektrum um Clindamycin-Sulfoxid (bioaktiver Metabolit), Vancomycin (Reserveantibiotikum mit hoher Relevanz für Antibiotikaresistenzen) sowie um die Krankenhaus-spezifischen Beta-

Laktame Cefotaxim und Piperacillin erweitert (Mühlbauer 2014).

Methoden

Untersuchungsgebiet

Im Fokus der Untersuchungen stand die Quantifizierung der ausgewählten Antibiotika entlang des regulären Abwasserfließweges vom Kanalnetz im Stadtgebiet und im Universitätsklinikum bis hin zur zentrale Kläranlage (740.000 Einwohnerwerten). Dabei wurden sowohl diverses Abwasser als auch im Abwassersystem enthaltene Feststoffe (Sediment, Klärschlämme) auf gelöste und adsorbierte Antibiotika untersucht. Zusätzlich wurden Proben aus einem Fließgewässer entnommen, welches den Abwasserfließweg vom Kanal ins Oberflächengewässer im Entlastungsfall (Misch- und Regenwasserentlastung) abbildet (Tabelle 1).

Probenahme

Für Mischproben des Krankenhausabwassers (2 und 4h MP), Roh- und behandeltes Abwasser der Kläranlage Dresden Kaditz (6 und 24h MP) wurden Probenautomaten genutzt, die zeitproportional das Abwasser in bis zu 24 Flaschen automatisch sammeln (Rossmann et al. 2014, Schubert et al. submitted). Stichproben wurden sowohl aus Oberflächenwässern als auch aus dem Kanalnetz in Form von wässrigen Proben entnommen. Außerdem wurden Sedimente des Abwassersystems und Klärschlämme innerhalb der Kläranlage beprobt. Für die Beprobung von Biofilmen wurden Aufwuchskörper aus Kunststofffolienstreifen (SESSIL®, Norddeutsche Seekabelwerke GmbH) verwendet, die am Gewässergrund befestigt werden, sich der Wasserfließrichtung anpassen und in der Praxis zu geringer Verblockung im Vergleich zu starren Aufwuchskörpern führen (Benisch 2014, Murzen & Zehle 2011).

wässrige bzw. Feststoffphase des Abwassersystems	Charakterisierung der Proben
Oberflächengewässer	
Fließgewässer im Stadtgebiet: Biofilm und Oberflächenwasser	- Fließgewässer teilweise im Stadtgebiet, mündet dort in die Elbe - wird als Vorfluter für Misch- und Regenwasserentlastung im Stadtbezirk genutzt - stromaufwärts Einleitung von kommunaler KA (11.500 EW)
Abwasserkanal	
im Stadtbezirk: Sediment und Rohabwasser	- aus Teileinzugsgebiet - meist sandig - Eintrag von umliegenden Oberflächen durch Regenereignisse, kann bei Trockenperioden längere Zeit im Abwasserkanal verweilen
im Universitätsklinikum: Klinikabwasser	Abwasser aus dem klinischen Bereich (Chirurgie)
Kläranlage	
Sediment Sandfang	- aus Gesamteinzugsgebiet der KA Dresden Kaditz - Sediment im Rohabwasser mit hohem mineralischen Anteil, leicht sedimentierend (mechanische Reinigungsstufe)
Primärschlamm (primary sludge)	- aus Gesamteinzugsgebiet der KA Dresden Kaditz - Rohabwasser gelangt ins Vorklärbecken, Abtrennung weiterer Feststoffe wird als PS bezeichnet - hauptsächlich weniger schnell sedimentierende Schwebteile, höherer organischer Anteil
Faulschlamm (digested sludge)	- aus Gesamteinzugsgebiet der KA Dresden Kaditz - weitere Klärschlammbehandlung, unter anaeroben Bedingungen entsteht FS - wird in Faultürmen stabilisiert und zur Biogasproduktion genutzt
Abwasser: Rohabwasser (Zulauf) und gereinigtes Abwasser (Ablauf)	- Kläranlage Dresden Kaditz 740.000 EW - Rossmann et al. 2014

Tabelle 1: Lokalisierung der Probenahmestellen und Charakterisierung der Proben im Dresdner Abwassersystem

Probenvorbereitung und Analytik

Für die Bestimmung der ausgewählten Antibiotika wurden Abwasser, Oberflächenwasser und der Biofilm mit Na₂-EDTA vermischt, auf pH 3,5 angesäuert und anschließend über Festphasenextraktion (SPE) mit einer 30 mg OasisHLB Kartusche (Waters, USA) extrahiert (Rossmann, et al. 2014). Die an den Feststoffen des Abwassersystems gebundenen Antibiotika wurden mittels USE mit ACN/EDTA-McIlvaine Puffer pH 4,5 (1:1, v/v) und anschließender SPE über 60 mg Oasis HLB Kartuschen extrahiert (Schubert 2014). Bei beiden Methoden wurden die Proben vor der Extraktion jeweils mit einem Mix der ausgewählten Antibiotika und isotope-markierten Standards versetzt.

Die Abwasser- bzw. Feststoffextrakte wurden über LC-MS/MS (ESI+, MRM) bestimmt, wobei sowohl eine SynergiHydroRP Säule (Phenomenex, Deutschland) als auch eine NUCLEOSHELL® HILIC Säule (Machery-Nagel, Deutschland) benutzt wurden (Rossmann et al. 2014).

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 nach ihren Entnahmestellen sortiert und farblich in Konzentrationsklassen unterteilt. Die Analyse der ambulanten und klinischen Verschreibungsdaten zeigte, dass die Beta-Laktame (Penicilline und Cephalosporine) die am häufigsten eingesetzten Antibiotika im Untersuchungsgebiet darstellen und dass die Makrolide einem ausgeprägtem saisonalen Verschreibungsmuster folgen (Mühlbauer 2014).

Im Abwasser des Kanalnetzes (häusliches und klinisches) wurden neben den deutlich hohen Konzentrationen an Beta-Laktamen auch die untersuchten Makrolide, Fluorchinolone als auch Doxycyclin, Sulfamethoxazol und Trimethoprim in hohen Konzentrationen nachgewiesen. Dies entspricht den Erwartungen für den Eintragsort der Antibiotika in den Abwasserkanal. Beim Vergleich von Rohabwasser (hauptsächlich häuslichen Ursprungs) und Abwasser aus dem Klinikbereich zeigte sich, dass das Krankenhaus für nur sehr wenige Antibiotika einen Eintragsort mit höheren Konzentrationen darstellt. Die Beta-Laktame Piperacillin und Cefotaxim werden ausschließlich und Cefuroxim hohen Mengen im klinischen Bereich angewendet und dementsprechend auch im Klinikabwasser in hohen Konzentrationen nachgewiesen. Antibiotika, wie Amoxicillin, Penicillin V und die Makrolide werden dagegen im Klinikbereich kaum angewendet, hauptsächlich ambulant eingesetzt und auch im häuslichen Abwasser verstärkt nachgewiesen. Im Kanalnetzsediment konnte eine hohe Adsorption von Ciprofloxacin nachgewiesen werden. Andere Antibiotika sind im Sediment in geringeren Konzentrationen nachweisbar, Beta-Laktame und Vancomycin dagegen gar nicht.

Im Zulauf der KA konnten alle untersuchten Antibiotika nachgewiesen werden, im Vergleich zu den Stichproben aus dem Kanalnetz aber in deutlich geringeren Konzentrationen. Cefuroxim wurde an dieser Stelle dennoch in Konzentrationen von > 1 µg/l (Medianwert, Rossmann et al. 2014) bestimmt. Im

Ablauf der Kläranlage konnten die meisten der untersuchten Antibiotika deutlich reduziert werden, mit Ausnahme der Makrolide, die keine bzw. nur eine geringe Reduktion zeigten. Im Sediment des Sandfangs wurden hohe Konzentrationen an Antibiotika nachgewiesen. Beim Vergleich von Primär- und Faulschlamm zu den untersuchten Sedimenten im Kanalnetz als auch im Sandfang der KA zeigte sich eine Abnahme der nachgewiesenen Antibiotika (Schubert 2014). Besonders während der Klärschlammbehandlung (z.B. anaerobe Bedingungen beim Faulschlamm) kann es zum Abbau der an die Feststoffe gebundenen Antibiotika kommen (Kümmerer 2009b). Die verstärkte Adsorption von Antibiotika an Sedimente im Kanalnetz könnte durch das mit deutlich höheren Antibiotikakonzentrationen behaftete Rohabwasser bedingt sein. Die Beta-Laktame, Sulfamethoxazol und Vancomycin wurden in den untersuchten Klärschlämmen nicht nachgewiesen. Außerdem konnten Clindamycin und Clindamycin-Sulfoxid in den Klärschlämmen nicht nachgewiesen werden, obwohl sie an Sedimente des Abwassersystems adsorbieren und im Abwasser der KA enthalten sind. Fluorchinolone, Tetracycline und Sulfonamide zeigten in jüngsten Studien eine teilweise starke Anlagerung an Klärschlämme (Lillenberg et al. 2009, Pamreddy et al. 2013). Dies konnte für die untersuchten Fluorchinolone und Doxycyclin in unseren Untersuchungen bestätigt werden. Sulfamethoxazol konnte allerdings nur im Biofilm und Kanalnetzsediment nachgewiesen werden.

Im untersuchten Fließgewässer (Vorfluter zur Misch- und Regenwasserentlastung, stromaufwärts Ablauf einer kommunalen KA) konnten im Biofilm als auch im Oberflächenwasser Cefuroxim, Doxycyclin und Sulfamethoxazol stellenweise in Konzentrationen > 100 ng/l nachgewiesen werden. Generell können Regenereignisse zu einem temporären Eintrag von an Feststoffen gebundenen Antibiotika in angrenzende Oberflächengewässer führen; dieser Eintrag kann aber durch technologisch und wirtschaftlich effiziente Maßnahmen (z.B. Kanalnetzsteuerung, Rückhaltebecken) minimiert werden (Käseberg et al. 2014). Der Eintrag an Antibiotika über den Ablauf der Kläranlage führt zu einer kontinuierlichen Belastung der aquatischen Umwelt, auch wenn einige der untersuchten Antibiotika (Makrolide) einer saisonalen Schwankung unterliegen (Marx et al. *submitted*, Schubert et al. *submitted*).

Fazit/Ausblick

Generell zeigten Fluorchinolone, Makrolide und Doxycyclin eine hohe Stabilität innerhalb des Abwasserkanaals und der Kläranlage. Diese Antibiotika haben folglich ein langfristig erhöhtes Eintragspotenzial in die (aquatische) Umwelt. Für die Beta-Laktame, die ambulant als auch stationär verstärkt eingesetzt werden, konnte dagegen kaum ein erhöhter Eintrag über die Kläranlage nachgewiesen werden. Limitierend muss eingeräumt werden, dass nur die Primärelimination in diesem Projekt betrachtet wurde und Metabolite sowie Transformationsprodukte der untersuchten Antibiotika durchaus

antimikrobielle bzw. toxische Wirkungen aufweisen können. Inwieweit die Ergebnisse der Untersuchungen eine Relevanz für eine verstärkte Resistenzbildung mit Bedeutung für Mensch und Umwelt haben, muss in gezielten Studien untersucht werden.

Die Bewertung ambulanter bzw. stationärer Verschreibungsdaten allein kann zu einer deutlichen Über- bzw. Unterschätzung des Antibiotika-Eintrages in die aquatische Umwelt führen. Zusätzliche sollten substanzspezifische Faktoren berücksichtigt werden: Pharmakokinetik (Metabolismus, Exkretion), Transport-, Adsorptions- und Stabilitätsverhalten im Abwassersystem sowie Saisonalität in der Verschreibung und im Abwasser (Langzeitbeobachtung).

Literatur

- Benisch J (2014). Characteristics of antibiotics: Application of the TTC test for the detection of antibiotic resistance in a creek biofilm and influence of pH on the desorption characteristics of antibiotic compounds from different sediments. Master thesis Institute for Urban Water Management, TU Dresden
- Brooks BW, Huggett DBE (2012). Human Pharmaceuticals in the Environment: Current and Future Perspectives. Emerging Topics in Ecotoxicology - Principles, Approaches and Perspectives, 4. Springer Sciences and Business Media, New York
- Käseberg T, Blumensaat F, Zhang J, Krebs P (2014). Spülstoßeffect gelöster und feststoffgebundener Antibiotika und resultierendes Umweltrisiko bei Mischwasserentlastungen. Prävention und Gesundheitsförderung 9, 206-210 DOI: 10.1007/s11553-014-0450-5
- Kümmerer K (2009a). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. Chemosphere 75, 417-434.
- Kümmerer K (2009b). The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. Journal of Environmental Management 90, 2354-2366.
- Lillenberg M, Yurchenko S, Kipper K, Herodes K, Pihl V, Sepp K, Löhms R, Nei L (2009). Simultaneous determination of fluoroquinolones, sulfonamides and tetracyclines in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography electrospray ionization-mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1216, 5949-5954
- Marx C, Mühlbauer V, Schubert S, Oertel R, Ahnert M, Krebs P. Seasonal recovery rate of antibiotics at the WWTP using in- and outpatient prescription data(submitted).
- Mühlbauer V (2014). Datengetriebene Ermittlung des ambulanten und stationären Antibiotikaverbrauchs am Beispiel der Stadt Dresden. Prävention und Gesundheitsförderung 9, 191-197 DOI: 10.1007/s11553-014-0454-1
- Murzen R & Zehle C (2011). Probenahme- und Analyseverfahren zur kostengünstigen Überwachung von Arzneimittelwirkstoffen im Abwasser. gwf Wasser Abwasser 6/2011 Jahrgang 152

Pamreddy A, Hidalgo M, Havel J, Salvado V (2013). Determination of antibiotics (tetracyclines and sulfonamides) in biosolids by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1298, 68-75.

Rossmann J, Schubert S, Gurke R, Oertel R, Kirch W (2014). Simultaneous determination of most prescribed antibiotics in multiple urban wastewaters by SPE-LC-MS/MS. Journal of Chromatography B 969, 162–170

Schubert S (2014). Identifikation von Antibiotika im urbanen Abwassersystem: Akkumulation an Sediment und Klärschlamm. Prävention und Gesundheitsförderung 9, 171-174. DOI: 10.1007/s11553-014-0457-y

Schubert S, Mühlbauer V, Oertel R, Knoth H, Fauler J. Hospital contribution of frequently prescribed antibiotics into an urban wastewater system (*submitted*).

Korrespondenzadresse:

Sara Schubert
Institut für Klinische Pharmakologie
Technische Universität Dresden
Fiedlerstraße 27
01307 Dresden

		Beta-Laktame					Makrolide	Fluor- chinolone		andere Antibiotika						
		Penicilline			Cephalo- sporine											
		Amoxicillin	Penicillin V	Piperacillin	Cefuroxim	Cefotaxim		Azithromycin	Clarithromycin	Roxithromycin	Ciprofloxacin	Levofloxacin	Doxycyclin	Sulfamethoxazol	Trimethoprim	Clindamycin
Fließ- gewäs- ser	Biofilm ¹															
	Oberflächen- wasser ¹															
Ab- wasser -kanal	Sediment ³															
	Rohabwasser															
	Klinikabwasser ⁴															
Kläran- lage	Sediment Sandfang ³															
	Primärschlamm ³															
	Faulschlamm ³															
	Rohabwasser (Zulauf) ²															
	gereinigtes Abwasser (Ablauf) ²															

Antibiotika in µg/kg Trockenmasse				
k	in	< 200	200	> 400
e	Spu-		bis	
i	ren		400	
n				
e				

Antibiotika in ng/l				
K	in	< 100	100	> 1000
e	Spu-		bis	
i	ren		1000	
n				
e				

Tab. 2: Vorkommen der häufig verschriebenen Antibiotika im urbanen Abwassersystem am Beispiel der Stadt Dresden. Daten nach¹Benisch (2014),²Rossmann et al. (2014), ³Schubert (2014), ⁴Schubert et al. (*submitted*)