

Chinolone wie das veterinärmedizinisch eingesetzte Enrofloxacin werden von vielen Erdboden, Dung oder Holz bewohnenden Ständerpilzen abgebaut. Einige Schimmelpilze, Hefen sowie Bakterienarten metabolisieren den Aminsubstituenten an C-7, was bereits mit einem weitgehenden Verlust der antibakteriellen Wirksamkeit verbunden ist. Obwohl bisher nur relativ geringe  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzungsraten aus den Positionen C-2 und C-4 des heterocyclischen Moleküllerns gemessen werden konnten, ist im Mist von Nutztieren mit einer relativ raschen Biotransformation und damit Inaktivierung dieser Wirkstoffe zu rechnen.

## Chinolone in der Umwelt: Biologische Abbaubarkeit der Gyrasehemmer

HEINZ-GEORG WETZSTEIN

Aufgrund ihrer hohen klinischen Wirksamkeit und guten Verträglichkeit werden Fluorchinolone (FQs), oft einfach Chinolone genannt, weltweit in der Human- und Veterinärmedizin zur Behandlung bakterieller Infektionen eingesetzt [1 - 3]; derzeit sind es jeweils etwa ein halbes Dutzend Wirkstoffe [4, 5]. Die verbrauchten Mengen sind unbekannt. Eine Schätzung ergab 1998 für 30 Industrieländer 900 t pro Jahr, wobei der veterinärmedizinische Anteil etwa 10 % betrug [5]. Die hohe chemische Stabilität der FQs führte in letzter Zeit vermehrt zu Spekulationen über mögliche Aktivitäten dieser Stoffe in der Umwelt, so z.B. über eine fortdauernde Resistenzselektion durch Wirkstoffreste, die nach der therapeutischen Anwendung auf unterschiedlichen Wegen in die Umwelt gelangen. In diesem Beitrag wird zunächst der aktuelle Kenntnisstand zum mikrobiellen Abbau von FQs unter Laborbedingungen zusammengefasst. Daraus werden dann Vorhersagen zum Verhalten von Wirkstoffresten in der Umwelt abgeleitet.

### Bedeutung des Fluorsubstituenten

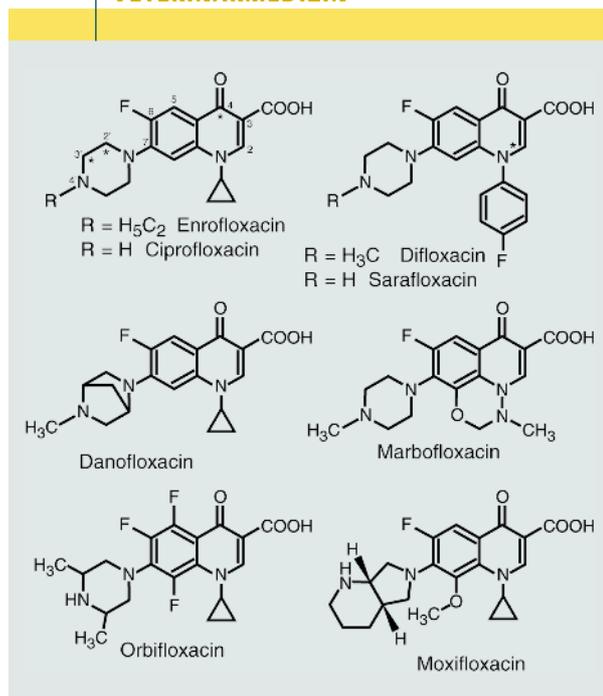
FQs sind synthetische Substanzen, deren antibakterielle Potenz maßgeblich vom Fluorsubstituenten in Position C-6 bestimmt wird (Abb. 1); seine Eliminierung führt zu Stoffen

mit geringer Restaktivität (s.u.) [7]. Da aromatisch gebundenes Fluor in Naturstoffen bisher nicht gefunden wurde [8, 9], werden FQs zu den Xenobiotika, d.h. naturfremden Stoffen, gerechnet, was zwangsläufig Fragen nach weiteren „antibiotischen“ Aktivitäten, z.B. denen in der Umwelt, sowie nach ihrer biologischen Abbaubarkeit nach sich zieht.

### Enrofloxacin als Modellsubstanz

Die meisten experimentellen Befunde betreffen den Veterinärwirkstoff Enrofloxacin [2]; Dano-, Di-, Marbo-, Orbi- und Sarafloxacin (Abb. 1) werden ebenfalls in der Veterinärmedizin eingesetzt. Enrofloxacin wurde seit 1987 in über 50 Ländern zugelassen. Es ist ausschließlich für die therapeutische Anwendung durch Veterinärmediziner vorgesehen. Schwere bakterielle Infektionen der Atemwege und des Verdauungstraktes bei Nutztieren (Rind, Schwein und Geflügel) sowie zusätzlich Infektionen des Urogenitaltraktes und der Haut bei Hunden und Katzen sind die Hauptindikationen. Als bedeutendste Erreger gelten *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Haemophilus somnus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Actinobacillus pleuropneumoniae*, verschiedene Arten der Gattung *Mycoplasma* sowie *Staphylococcus intermedius*. Therapeutische Dosie-



**ABB. 1 FLUORCHINOLONE AUS DER VETERINÄRMEDIZIN**


Positionen von <sup>14</sup>C-Markierungen sind durch einen Stern gekennzeichnet. Die Humantherapeutika Ciprofloxacin und Moxifloxacin dienten dazu, wichtige Befunde zum Abbau von Enrofloxacin in unabhängigen Versuchsreihen zu verifizieren.

rungen liegen im Bereich von 2,5 bis 10 mg/kg Körpergewicht. Anwendungen in subtherapeutischen Dosierungen, z.B. als Wachstumsförderer in der Tiermast, sind nicht zugelassen. Der weitaus größte Anteil der verabreichten Wirkstoffmenge entfällt auf Nutztiere [5].

Themenkreise wie „Antibiotika in der medizinischen Versorgung der Nutztiere“ oder die kontroverse Diskussion zur intensiven Tierhaltung können hier nicht behandelt werden (siehe hierzu [12 - 16]).

### Begrenzte Metabolisierung von FQs bei Säugern

Die umfangreichen Befunde zur Metabolisierung von FQs im Menschen sowie bei Labortieren (Maus, Ratte, Hund und Affe) wurden kürzlich zusammengefasst [17]. Bekannte Abbauaktivitäten für verschiedene Amins substituenten an Position C-7 (Abb. 1) umfassen:

- die Bildung von N-Oxiden (vgl. Abb. 2, F-14; „F“ steht für „fungal metabolite“);
- N-Dealkylierungen, wobei eine Methyl- oder Ethylgruppe vom distalen Stickstoff N-4' abgespalten wird (so entsteht z.B. aus Enrofloxacin Ciprofloxacin), sowie
- den Abbau des Amins substituenten über verschiedene Zwischenstufen bis zur Aminogruppe (F-15, F-4 und F-9).

Fast alle entstehenden Metaboliten haben nur noch eine geringe antibakterielle Restaktivität (s.u.). Abbaureaktionen für den Moleküllern wurden nicht beobachtet. FQs werden häufig in unterschiedlichem Ausmaß durch Glucuronidierung ihrer Carboxylgruppe oder durch Sulfatierung des distalen Stickstoffs im Amins substituenten metabolisiert. Dies führt ebenfalls zum Verlust ihrer antibakteriellen Wirksamkeit [7, 17], erhöht die Wasserlöslichkeit und fördert ihre Ausscheidung. Abgesehen von N-4'-Dealkylierungen, die meist keinen Aktivitätsverlust zur Folge haben, liegt der metabolisierte Anteil einer verabreichten Dosis allgemein unter 25 % [17]; der Rest wird unverändert über Urin und Faeces ausgeschieden.

### Potenzielle Ursachen einer „schweren“ biologischen Abbaubarkeit von FQs

Bald nach der Einführung der FQs wurden erste Bedenken hinsichtlich ihrer biologischen Abbaubarkeit sowie der potenziellen Gefahr einer Resistenzselektion geäußert [18]. Zunächst schien das Fluor-aromatische Strukturelement als Hauptursache für die vermutete schwere Abbaubarkeit in Frage zu kommen. Weiterhin war vorstellbar, dass voluminöse Substituenten wie z.B. die Cyclopropylgruppe und der Piperazinrest von Enrofloxacin (Abb. 1) oder der hohe Substitutionsgrad (im Vergleich zu Chinolin) einen enzymatischen Angriff erschweren oder gar verhindern. Chemisch betrachtet sind die meisten FQs ausgesprochen hydrolyse- und temperaturstabil. UV-Licht induziert jedoch Zersetzungsreaktionen, wobei dieser Aspekt für den Abbau

### NUTZTIERHALTUNG

Allein in Deutschland werden ständig etwa 15 Millionen Rinder, 25 Millionen Schweine sowie 100 Millionen Hühner zur Erzeugung von Nahrungsmitteln gehalten [10, 11].

### RECHENEXEMPEL: VERBLEIB HUMANMEDIZINISCHER FQs

Die jährlich in Deutschland in der Humanmedizin eingesetzte FQ-Menge ist nicht bekannt, ebensowenig FQ-Konzentrationen in Restschlämmen. Folgende Abschätzung soll die Dimension solcher Konzentrationen umreißen: In Deutschland wurden 1992 etwa 33 % des nach der Abwasserbehandlung verbleibenden Restschlammes, d.h. 800.000 t Trockensubstanz, nach weiteren Prozessierungsschritten wie Trocknung oder Kompostierung auf 483.000 ha Ackerfläche (5 % der Gesamtfläche [11]) ausgebracht. Der Rest wurde verbrannt oder deponiert [28]. Angenommen, der jährliche FQ-Verbrauch in der Humanmedizin in Deutschland läge bei 5 % des 1998 geschätzten Verbrauchs in den 30 Industriestaaten (800 t), dann sollten sich 40 t FQs im gesamten Restschlamm, bzw. 1/3 davon in dem auf Felder ausgebrachten Anteil befinden; das wären 13 t FQs in 800.000 t Restschlamm, was einen Gehalt von 16 mg FQs/kg entspräche. Nach Einbringung in den Boden (2 t Trockensubstanz pro Hektar; die oberen 5 cm des Bodens entsprechen einer Masse von etwa 750 t/ha) läge die Konzentration von FQs im Ackerboden bei 0,04 mg/kg. Unter Berücksichtigung des Bindens (der bioverfügbare Anteil sei 1 %) ist dann – bei einer freien Konzentration von 0,0004 mg/kg (etwa 1/40 des MHK von E. coli) – nicht mit einem Selektionsdruck für FQ-Resistenz zu rechnen.

Angesichts der oben erwähnten Teilmetabolisierung der Wirkstoffe (< 25 %) und unter Berücksichtigung von Abbauvorgängen (s.u.) wären noch niedrigere Wirkstoffkonzentrationen zu erwarten. Andererseits stellt die vorausgesetzte homogene räumliche und zeitliche Verteilung von Wirkstoffresten im Ackerboden eine bedenkenswerte Vereinfachung dar, d.h. lokale Konzentrationen könnten gegebenenfalls auch höher sein.

## PREDICTED ENVIRONMENTAL CONCENTRATION DER VETERINÄR-FQs

Für Difloxacin liegen die PECs nach Ausbringung von Geflügelmist in der Größenordnung von 0,03 - 0,13 mg/kg Boden [34]. PECs für Rinderdung sind deutlich niedriger: für Marbofloxacin wurden z.B. 0,01 mg/kg Ackerboden bzw. 0,07 mg/kg Boden von Weiden errechnet [24]; PECs für Schweinegülle nehmen eine Mittelstellung ein. Dieser Konzentrationsbereich ist analytisch kaum noch zugänglich, und entsprechend sind Messergebnisse zu In-situ-Wirkstoffgehalten nicht verfügbar. Die MHK-Werte von Sara-, Marbo-, Di- oder Enrofloxacin für typische Bodenbakterien erhöhten sich in Gegenwart von Ackerboden um den Faktor 1000 [23] bzw. auf bis zu > 1000 mg/kg Boden [24, 34, 36]. Konzentrationen von FQs in Ackerboden, durch die ein Selektionsdruck für Resistenz bei der ausgesprochen empfindlichen Art *E. coli* erzeugt werden könnte, liegen wahrscheinlich bei über 20 mg/kg [36]; damit ergäbe sich, bezogen auf die kritischsten PECs, ein Sicherheitsfaktor von mindestens 200. Selbst die theoretischen PECs wären also bei weitem zu gering, um einen entsprechenden Selektionsdruck zu erzeugen.

in Faeces und Ackerboden nicht von primärer Bedeutung ist.

Wirkstoffreste aus Anwendungen in der Veterinärmedizin können über Faeces, Mist, Jauche und Gülle von Nutztieren auf Wiesen und Äcker gelangen (s.u.). Schon frühzeitig war beobachtet worden, dass FQs von Faeces und Ackerböden äußerst stark gebunden werden [19 - 22]. Enrofloxacin [19], Sarafloxacin [23] oder Marbofloxacin [24] sind im Ackerboden nahezu immobil. Aus ökologischer Sicht ist dieses Binden ausgesprochen vorteilhaft: Der Wirkstoff wird lokal festgelegt, und der bioverfügbare Anteil verringert sich auf z.T. deutlich unter 1 %. Andererseits war zu erwarten, dass durch ein derartig intensives Binden auch der biologische Abbau deutlich verzögert würde [25].

### Wirkstoffreste in Humanfaeces, Abwasser, Restschlamm und Ackerboden

Wirkstoffkonzentrationen in Faeces können Werte von bis zu 2 g/kg erreichen [21]. Entscheidend ist, wie schnell und in welchem Ausmaß diese bakteriziden Konzentrationen [26] nachfolgend ausverdünnung werden. Im Abwasser eines Krankenhauses wurden 0,003 bis maximal 0,087 mg Cipro-

floxacin/L gemessen [27]; der ermittelte Durchschnittswert (0,015 mg/L) entspricht der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Ciprofloxacin für typische Wildtyp-Stämme von *E. coli*. Dieser Wert soll nachfolgend als Bezugswert für Abschätzungen des Selektionsdruckes dienen. Im Labor lassen sich FQ-resistente Klone bei Konzentrationen von 2 bis 8 x MHK selektionieren (s. „Rechenexempel: Verbleib humanmedizinischer FQs“).

### FQ-Reste in Mist und Gülle von Nutztieren

Tier- oder indikationsspezifische Verbrauchsmengen für FQs sind ebensowenig berichtet worden wie FQ-Konzentrationen in Faeces von Rindern und Schweinen. Unter Standardtherapie lagen in frischer Hühnergülle maximal 15 mg Enrofloxacin pro kg vor [29]. Da beim Geflügel der gesamte Bestand behandelt wird, kommt es nicht zur Verdünnung von Wirkstoffresten durch die Gülle unbehandelter Tiere; allerdings ist in der Einstreu (Sägespäne oder Stroh) mit einer Inaktivierung der FQs zu rechnen (s.u.).

Tendenziell liegen Wirkstoffgehalte in Faeces von Rindern und Schweinen wegen etwas geringerer Aufwandmengen (Dosis, Behandlungsdauer) [1, 2] und des höheren Kotvolumens [30] niedriger als beim Menschen; sie werden zudem unmittelbar durch Urin und Kot von unbehandelten Tieren verdünnt. Danofloxacin z.B. wurde von Faeces so stark gebunden, dass es zu weniger als 1 % bioverfügbar war [31]. Mist, Jauche und Gülle von Nutztieren gelangen nach einer Zwischenlagerung (im Winterhalbjahr) als Dünger auf Felder und Wiesen. Diese Ausbringung unterliegt strengen gesetzlichen Bestimmungen. So dürfen in Deutschland seit dem 1. Juli 1997 auf Ackerland nicht mehr als 170 kg Stickstoff pro ha und Jahr ausgebracht werden [32]. 1999 wurde die in Großbritannien jährlich anfallende Menge an Stallmist von Nutztieren auf etwa 20 Millionen Tonnen (Trockensubstanz) geschätzt [14]; die Tierzahlen waren dabei etwas niedriger als in Deutschland. Derartige Mengen sowie die vergleichsweise niedrigen FQ-Aufwandmengen in der Veterinärmedizin lassen, verglichen mit Restschlämmen, niedrigere Konzentrationen von Wirkstoffrückständen in Mist und Ackerboden erwarten.

> Misthaufen werden vor ihrer Verteilung auf dem Feld häufig zwischengelagert

>> Aufgelockert durch die Einstreu bietet der Misthaufen ideale Bedingungen für biologische Abbauprozesse



Angesichts der vielfältigen Indikationen und Applikationsschemata für FQs bei Nutztieren sowie sehr unterschiedlicher Entsorgungsverfahren für Mist und Gülle müssen im Rahmen des Zulassungsverfahrens Abschätzungen zu den unter ungünstigsten Umständen zu erwartenden Wirkstoffkonzentrationen im Ackerboden (PEC, von *predicted environmental concentration*) vorgenommen werden. Zu diesen Annahmen gehören z.B. die Behandlung maximaler Tierzahlen in einem Bestand oder die lokale Ausbringung der gesamten eingesetzten Wirkstoffmenge in unveränderter Form [33] (s. „Predicted environmental concentration der Veterinär-FQs“).

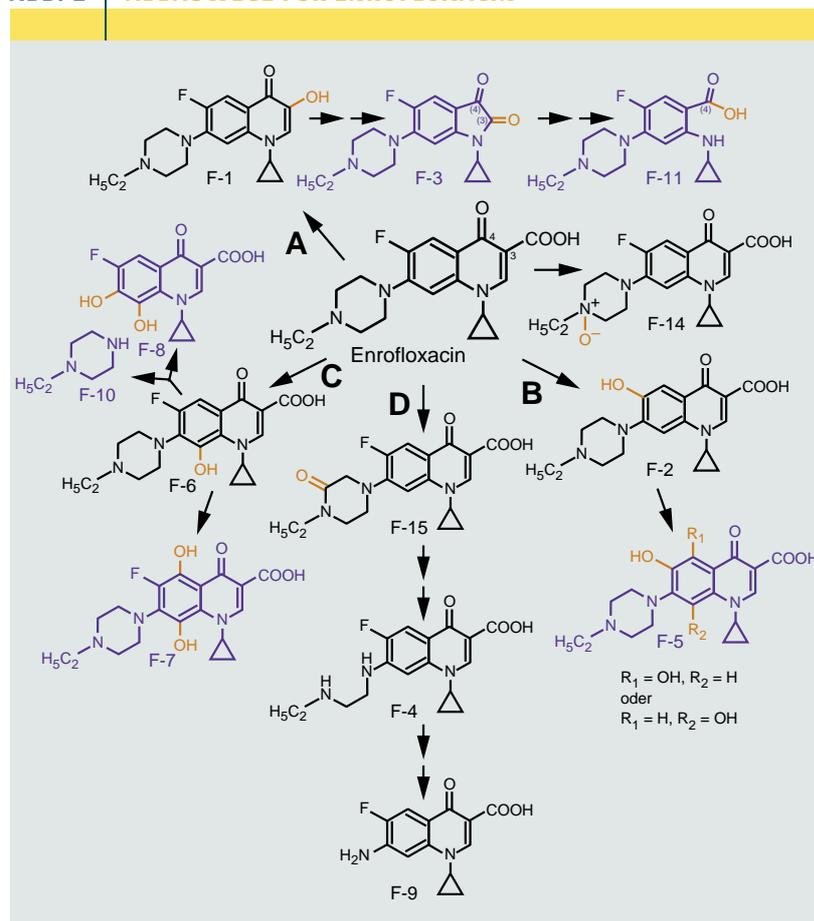
### Erste Befunde zum biologischen Abbau von FQs in Erdböden

Im Rahmen des Zulassungsverfahrens für Arzneimittel zur Anwendung bei Nutztieren waren in den USA bereits vor über 10 Jahren relativ umfangreiche Untersuchungen zur Umweltverträglichkeit vorgesehen [22], darunter auch die Prüfung auf Abbaubarkeit im Ackerboden. Hierbei sollte  $^{14}\text{C}$ -markierter Wirkstoff in drei verschiedene Böden eingebracht und sein Abbau anhand der Freisetzung von  $^{14}\text{CO}_2$  aus der jeweiligen Markierungsposition über die Zeit erfasst werden. Glukose oder Aminosäuren wurden als Substanzen mit guter biologischer Abbaubarkeit angeführt; für sie sind Werte von  $> 50\%$   $^{14}\text{CO}_2$  innerhalb von 64 Tagen leicht darstellbar [35, 36]. Für FQs jedoch, die eine  $^{14}\text{C}$ -Markierung im heterocyclischen Moleküllern (C-2 oder C-4) trugen, konnten nur äußerst geringe  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzungsraten beobachtet werden, so z.B.  $0,6\%$  aus [2- $^{14}\text{C}$ ]-Sarafloxacin innerhalb von 3 Monaten [23]. Noch vor kurzem stuft man Difloxacin im Zulassungsverfahren als „im Boden persistierend“ ein [34], und für Marbofloxacin wurde eine Abbaurrate von  $1,4\%$  in 85 Tagen (ohne Angabe der Markierungsposition) berichtet [24]. Derartige Ergebnisse scheinen die vermutete schwere biologische Abbaubarkeit von FQs zu bestätigen.

### Nachweis der biologischen Abbaubarkeit von Enrofloxacin

Höhere Pilze aus der Gruppe der Ständerpilze (Basidiomyceten) sind für ihre Fähigkeit bekannt, eine breite Palette von Schadstoffen abzubauen zu können, darunter auch kondensierte und halogenierte Aromaten [37]. Versuche mit den Holz zersetzenden Species *Phanerochaete chrysosporium* und *Gloeophyllum striatum* erbrachten dann auch die ersten Hinweise, dass diese Pilze in der Lage sind, [ $^{14}\text{C}$ ]-Enrofloxacin abzubauen [38]. Kulturen auf Weizenstroh bildeten bald darauf schon bis zu  $50\%$   $^{14}\text{CO}_2$  innerhalb von 8 Wochen [39], womit die biologische Abbaubarkeit von Enrofloxacin grundsätzlich erwiesen war. Weizenstroh eignet sich jedoch nicht für Versuche zur Ermittlung der Struktur von Metaboliten. Hierzu diente ein mineralisches Mangelmedium, das weder Kohlenstoff noch Stickstoff oder Phosphat enthielt, jedoch Salze und Spurenelemente, insbesondere Eisen oder Mangan. Nach der

ABB. 2 | ABBAUWEGE FÜR ENROFLOXACIN

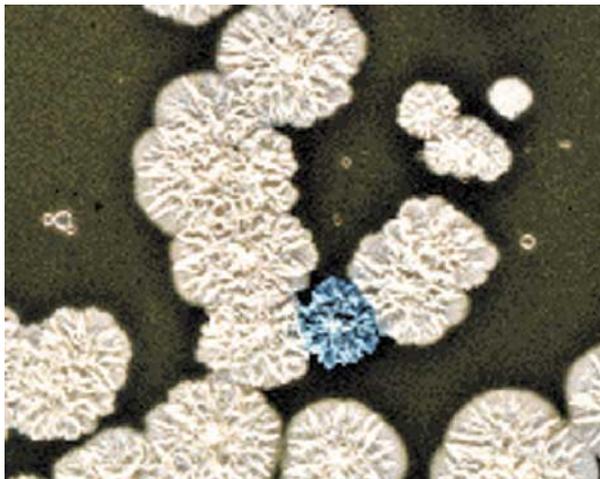


**Primäre Metaboliten und prinzipielle Abbauwege für Enrofloxacin bei *Gloeophyllum striatum*, der wahrscheinlich über einen Hydroxylradikal-abhängigen Abbau-mechanismus verfügt. Hydroxylierungsstellen sind rot gekennzeichnet. Alle in schwarz gedruckten Metaboliten wurden durch chemische Synthese nachgestellt und auf antibakterielle Restaktivität geprüft; mit Ausnahme von F-15 waren alle nahezu inaktiv. F-14 und F-15 wurden bisher bei *G. striatum* nicht nachgewiesen, sie werden jedoch von mehreren anderen Basidiomyceten gebildet (mit freundlicher Genehmigung der American Society for Microbiology, Washington, D.C.).**



**ABB. 3** Der Basidiomycet *Gloeophyllum striatum*. Diese tropische Art gehört zur Gattung der „Blätlinge“, die die sogenannte Braunfäule des Holzes hervorrufen. Dabei wird Cellulose bevorzugt abgebaut, und Lignin bleibt als braune, spröde Masse zurück. Oben: Oberseite eines Fruchtkörpers, dessen maximaler Durchmesser 8 cm betrug. Unten: Unterseite mit dem typischen, lamellenförmig ausgebildeten Hymenophor. In Mitteleuropa finden sich häufig an Weidenzapfen und auf gelagertem Nadelholz die Arten *G. abietinum* oder *G. sepiarium*. Die abgebildeten Fruchtkörper stammen aus dem Herbar von Dr. habil. H. Dörfelt, Universität Jena.

***Mycobacterium smegmatis*. Der Durchmesser der Bakterienkolonien auf Agar beträgt ca. 1,5 – 6 mm.**



Anzucht in einem nährstoffreichen Malzmedium wurden die Pilzmycelien gewaschen und in dieses Mangelmedium überführt [40]. Daraufhin exprimierten eine ganze Reihe von Basidiomyceten hohe Abbauprodukte für Enrofloxacin (s.u.).

### Metaboliten von Enrofloxacin, die von *G. striatum* gebildet werden

*G. striatum* (Abb. 3) wurde als Modellorganismus ausgewählt, da er auch im Mangelmedium [4-<sup>14</sup>C]-Enrofloxacin und [Piperazin-2,3-<sup>14</sup>C]-Enrofloxacin mit hoher Aktivität abbaute [39, 40]. Die dabei auftretenden Hauptmetaboliten erreichten schon nach wenigen Tagen maximale Konzentrationen zwischen 3 und 13 % und waren nach 1 Woche, ebenso wie der Wirkstoff, in Folgeprodukte umgewandelt.

In 2 Tage alten Kulturüberständen von *G. striatum* lagen u.a. die in Abb. 2 dargestellten mono- und dihydroxylierten Derivate von Enrofloxacin sowie einige niedermolekulare Metaboliten vor [40]. Vier Hauptmetaboliten (F-1, F-2, F-6 und F-4) waren gleichzeitig entstanden. Jeder leitet einen der prinzipiellen Abbauewege A bis D ein. Die

primären sowie alle nachfolgenden Metaboliten wurden vermutlich an allen geeigneten Stellen hydroxyliert, was theoretisch zu einer rasanten Verzweigung des Metabolitenschemas führt. Jedoch sind bereits die dihydroxylierten Metaboliten (z.B. F-5, F-7 und F-8) chemisch instabil, das heißt unter den Kulturbedingungen kurzlebig und analytisch nur noch schwer zu erfassen.

Die Metaboliten F-14 und F-15 konnten zwar bisher bei *G. striatum* nicht nachgewiesen werden, sie treten aber bei anderen Basidiomyceten aus Dung und Ackerboden sowie bei Säugern auf [17, 36]. Wegen der damit verbundenen Inaktivierung des Wirkstoffes ist die Bildung des N-Oxids (F-14) von großer ökologischer Bedeutung (s.u.). Offenbar bereitete die Eliminierung des Fluorsubstituenten keine besondere Schwierigkeit, denn F-2 erreichte mit etwa 8 % eine ähnliche maximale *steady-state*-Konzentration wie die anderen Hauptmetaboliten [40]. Alle nach der Eliminierung von Fluor auftretenden Metaboliten ähneln bereits Derivaten des Naturstoffs Chinolin, für die auch bakterielle Abbauprozesse bekannt sind [41].

Gleichartige Abbauschemata wurden auch für Cipro- und Moxifloxacin ermittelt [42, 43]. Ein weiterer Metabolit von Ciprofloxacin (F-12) trug anstelle des Fluoratoms eine Hydroxylgruppe und entsprach ansonsten F-4. Dieser Metabolit kann auf zwei Abbauewegen entstehen: Über Weg B aus F-2 durch Eliminierung einer Ethylengruppe oder über Weg D aus F-4 durch Ersatz des Fluors. Weiterhin ergaben sich Hinweise auf 5 zusätzliche Metaboliten, die direkt durch Decarboxylierung von F-2, F-4 und F-5 oder durch Hydroxylierung von F-1 und F-4 entstehen [42].

### Hinweise auf den Abbaumechanismus bei *G. striatum*

Das Metabolitenschema (Abb. 2) ist durch enzymatische Abbauewege kaum erklärbar. Es steht aber mit einem Hydroxylradikal-abhängigen Mechanismus in Einklang, den Koenigs schon vor etwa 30 Jahren für den Holzabbau durch Braunfäulepilze postuliert hatte, der so genannten „Fenton-Reaktion“ [44]:



Im Zuge seiner Reduktion durch  $\text{Fe}^{2+}$  zerfällt Wasserstoffperoxid in ein Hydroxylradikal ( $\text{OH}^\bullet$ ) sowie ein Hydroxydion ( $\text{OH}^-$ ). Das Hydroxylradikal oxidiert dann organische Moleküle, die sich in unmittelbarer Nähe befinden: Natürlicherweise Lignocellulose von Pflanzenresten, aber auch zufällig vorhandene Fremdstoffe wie z.B. FQs. Mechanistische Details und Angaben zur Physiologie und globalen ökologischen Bedeutung von Holzfäulepilzen finden sich anderweitig [45 – 49].

Es ist bemerkenswert, dass 5 charakteristische Metaboliten von Enrofloxacin (F-1, F-2, F-4, F-6 und F-9) auch nach chemischem Abbau des Wirkstoffes mit Fentons Reagenz identifiziert werden konnten [40].

## METABOLISIERUNGSREAKTIONEN

Das Metabolisierungsschema von Enrofloxacin gleicht einem gerade explodierenden Feuerwerkskörper: Jede Lichtspur entspricht einer Sequenz von Metaboliten. Folgende Reaktionen lagen vor:

- eine oxidative Decarboxylierung zu F-1 (A);
- die Eliminierung des ehemaligen C-2 gefolgt von einer Recyclisierung des Zwischenproduktes zum Isatin-Derivat F-3;
- die endgültige Spaltung des heterocyclischen Teils nach Elimination des ehemaligen C-3 zum Anthranilsäure-Derivat F-11;
- die Eliminierung von Fluorid zu F-2 (B);
- Hydroxylierungen des aromatischen Teils zu F-6, F-5, F-7 (B, C);
- die Eliminierung des intakten Aminsubstituenten (F-10), wodurch eine weitere Dihydroxyverbindung (F-8) entstand (C);
- der Abbau des Piperazinrestes über F-15 und F-4 bis zum 7-Amino-Chinoloncarbonsäurederivat F-9 (D).

## Antibakterielle Restaktivität von FQ-Metaboliten

Die antibakterielle Restaktivität der FQ-Metaboliten musste bestimmt werden um zu klären, ob diese zu einem Selektionsdruck für FQ-Resistenz beitragen könnten. Hierzu wurden F-1, F-2, F-4, F-6, F-9, F-14 und F-15 chemisch synthetisiert.

Ihre Restaktivität ergab sich durch einen Vergleich der MHK-Werte mit denen des Wirkstoffs bei *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13882. Für F-1 betrug sie < 1 %; für F-2 und F-6 lag sie zwischen 1 und 12 %, für F-4 und F-9 ergaben sich  $\leq 3$  %. Das 3'-Oxo-Derivat (F-15) hatte bei *S. aureus* mit 24 % die höchste Restaktivität [52 - 54], F-14 war inaktiv. Eine Aktivität von 1% bedeutet, dass der Metabolit in der hundertfachen Konzentration des Wirkstoffs eingesetzt werden musste, um das Wachstum der Testorganismen auf der Agaroberfläche zu hemmen.

Angesichts der chemischen Labilität der beschriebenen Metaboliten und der für eine biologische Aktivität erforderlichen hohen Konzentrationen liegt nahe, dass von derartigen Metaboliten in Faeces oder Ackerboden kein Selektionsdruck für FQ-Resistenz ausgeht.

## Abbaupotenzial bei Pilzen und anderen Mikroorganismen, die auf Weiden und in Ackerböden vorkommen

Die Frage, ob die mit *G. striatum* im Labor beobachteten Abbaupotenziale auch „im Feld“ auftreten, wurde auf zwei Wegen angegangen. Zum einen sollten Reinkulturen von taxonomisch möglichst unterschiedlichen Basidiomyceten von den relevanten Standorten Mist, Ackerboden und Weide auf Abbaupotenzial geprüft werden, zum anderen undefinierte Gesamtpopulationen aus den entsprechenden Matrices. Bisher zeigte sich, dass mindestens 25 Arten aus 14 Gattungen (9 Familien, 4 Ordnungen) in der Lage sind,  $^{14}\text{CO}_2$  aus [Piperazin-2,3- $^{14}\text{C}$ ]-Enrofloxacin freizusetzen [55]. Die meisten Arten (diverse Acker-, Dünger-, Trichter- sowie Tintlinge) gehören zu der zahlenmäßig größten und

wichtigsten Ordnung, den Agaricales. Noch laufende Arbeiten ergaben, dass diese Arten unter optimierten *In-vitro*-Bedingungen auch aus [4- $^{14}\text{C}$ ]-Enrofloxacin mit z.T. sehr hoher Aktivität  $^{14}\text{CO}_2$  bilden. 9 weitere auf Holzresten vorkommende Arten (aus 8 Gattungen) waren in der Lage, aus analogen Markierungspositionen bei Ciprofloxacin  $^{14}\text{CO}_2$  freizusetzen [42]. Damit ist sicher, dass viele Basidiomyceten über Mechanismen verfügen, FQs zu inaktivieren (s. „Abbaupotenziale in anderen Taxa“).

Angesichts der überraschenden Vielfalt an Mikroorganismen mit nachgewiesener Abbaupotenziale für FQs ist davon auszugehen, dass an Standorten, auf die Mist, Gülle und Restschlamm ausgebracht werden, ein großes Abbaupotenzial für FQ-Wirkstoffreste vorhanden ist.

## FQ-Abbau durch undefinierte Mikrobenpopulationen in natürlichen Matrices

Der biologische Abbau von organischer Materie wie Pflanzenresten oder Dung findet auf der Oberfläche und in den oberen Schichten des Erdbodens statt. Zunächst werden leicht verdauliche Komponenten wie Zucker und Proteine durch Bakterien und Schimmelpilze verwertet. Anschließend zerlegen höhere Pilze die verbliebenen schwer abbaubaren Polymere (vor allem Lignocellulose) in niedermolekulare Produkte. Dabei spielen radikalische Abbaumechanismen (Peroxidasen, Laccasen) eine entscheidende Rolle [48].

Da all diese Prozesse im Kuhfladen ablaufen, bietet sich dieser als ideales ökologisches Modellsystem an. Die komplexen biologischen Abläufe - von seiner Ablage über die Entstehung der gut belüfteten Matrix durch die Fraßaktivität von Insektenlarven, Käfern und Würmern bis zum Abbau der Restmatrix (überwiegend Lignocellulose) durch höhere Pilze - sind gut bekannt [58, 59]. Entsprechend wurden frische Dunghaufen auf einer Rinderweide eingezäunt und bis zu ihrem Übergang in die oberste Bodenschicht für etwa 3 bis 4 Monate beobachtet. Proben von diesen Standorten wurden nach unterschiedlichen Zeiten im Labor mit

## ABBAUPOTENZIALE IN ANDEREN TAXA

Eine andere Arbeitsgruppe untersuchte 23 Gattungen von Erdboden bewohnenden Bakterien, Hefen und Pilzen (außer Basidiomyceten) auf Abbaupotenziale für Danofloxacin. Es stellte sich heraus, dass die Bakterienarten *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium smegmatis* und *M. bisrum*, die Hefe *Candida lipolytica* sowie die Schimmelpilze *Penicillium chrysogenum* und *P. frequentans* in der Lage waren, den Aminteil von Danofloxacin bis zum (nahezu inaktiven) Metaboliten F-9 abzubauen [56]. Weiterhin wurde für den Schlauchpilz *Curvularia lunata* eine bemerkenswert hohe  $^{14}\text{CO}_2$ -Bildungsrate aus [2- $^{14}\text{C}$ ]-Danofloxacin bestimmt. Unlängst konnte eine dritte Arbeitsgruppe am Institute for Toxicological Research der FDA in Jefferson, Arkansas, zeigen, dass *Mucor ramannianus*, eine zu den Jochpilzen zählende Art, aus Enrofloxacin durch Desethylierung zunächst Ciprofloxacin bildete. Ciprofloxacin wurde nachfolgend an N-4' acetyliert, was vermutlich zur Aktivierung des Piperazinrings führt und dessen weiteren Abbau bis zu dem zu F-4 analogen Metaboliten einleitet [57].



Die Prüfung von Arzneimitteln zur Anwendung bei Nutztieren auf Abbaubarkeit im Ackerboden ist Bestandteil der Zulassungsanforderungen, falls bestimmte PEC-Werte überschritten werden.

## FQ-INAKTIVIERUNG

Offensichtlich werden FQs schon während der Zwischenlagerung von Mist weitgehend transformiert und damit inaktiviert.

<sup>14</sup>C-markierten FQs dotiert und auf <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Freisetzungsaktivität geprüft. Es zeigte sich, dass aus [4-<sup>14</sup>C]-markiertem Enrofloxacin nur eine sehr geringe Menge <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> (0,5 % pro Jahr) gebildet werden konnte. In parallelen Ansätzen mit [Piperazin-2,3-<sup>14</sup>C]-markiertem Enrofloxacin betrug die <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Bildung dagegen etwa 20 % [60]. Offensichtlich war das diagnostische Potenzial dieser Markierungsposition, Inaktivierung anzuzeigen, ungleich höher als das der Kernmarkierung. Zudem ist aus Abb. 1 ersichtlich, dass die <sup>14</sup>C-Markierung im Piperazinring von Enrofloxacin nur in einer der beiden Ethenbrücken (C-2' und C-3') vorlag. Da keine der beiden Brücken während des Abbaus präferiert werden dürfte, kann man davon ausgehen, dass der Anteil abgebauter Piperazinreste doppelt so hoch lag. An dieser Stelle ergab sich ein erster Hinweis auf einen relativ schnellen Inaktivierungsverlauf von Enrofloxacin in einer natürlichen Matrix. Vergleichbare Ergebnisse wurden anschließend mit frischem Rindermist von einem authentischen Misthaufen erzielt [36].

Ackerböden sind noch wesentlich komplexere Ökosysteme als Kuhfladen. Ihre vielfältige strukturelle Beschaffenheit und chemische Zusammensetzung, der variable Gehalt an organischem Kohlenstoff und Stickstoff, das Wetter und andere Parameter bestimmen die Aktivität der jeweils vorhandenen Fauna, Flora und Mikrobenpopulationen [61 – 63]. Humusbildung und Humusabbau befinden sich – im Vergleich zum Dung – eher in einem Fließgleichgewicht. Angesichts dieser Variabilität wurden einige gut charakterisierte Modell-Ackerböden quasi als „black-box“ [62] für verschiedene Experimente eingesetzt. So konnte *G. striatum*



Innerhalb eines Misthaufens gibt es verschiedene Bereiche, die unterschiedlichste Abbaubedingungen bieten.

*tum* in einem Sandboden, dessen natürliche Mikrobenflora durch Gamma-Bestrahlung ausgeschaltet worden war, [4-<sup>14</sup>C]-Enrofloxacin mit überraschend hoher Rate (1 % <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> pro Woche) abbauen. Würden dagegen aktiv (aus [4-<sup>14</sup>C]-Enrofloxacin) <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> bildende Strohkulturen von *G. striatum* mit nativem Ackerboden überschichtet, war nach einer Übergangsphase von wenigen Tagen nur noch 1/20 der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Bildungsrate zu beobachten. Offensichtlich hatte die Mikrobenpopulation des Bodens das Modell-Ökosystem Stroh inklusive *G. striatum* „unter Kontrolle“ genommen; die apparente Abbauraten von Enrofloxacin wurde hier durch einen populationsdynamischen Effekt bestimmt [39]. In allen von 33 geprüften Ackerböden von 5 Kontinenten war ein Abbaupotenzial für Enrofloxacin nachweisbar [64].

Stroh ist ein etwas überschaubareres Testsystem als Dung oder Ackerboden. Deshalb wurde steriles Weizenstroh in die oberste Schicht eines Ackerbodens eingegraben, um im Verlauf des Verrottungsprozesses Teile der Mikrobenpopulation quasi aus dem Boden zu „extrahieren“ und auf Abbaupotenzial prüfen zu können. Nach bestimmten Zeiten wurden Strohproben entnommen, mit <sup>14</sup>C-markiertem Wirkstoff dotiert und über 1 Jahr auf <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Freisetzung geprüft. Es kam zur Bildung von monatlichen 0,05 % <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> aus [4-<sup>14</sup>C]-Enrofloxacin bzw. von 5 % <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> aus dem Piperazinrest, für den maximal 25 % erreicht wurden [36]. Somit ergaben sich für verrottendes Stroh und Rinderdung ähnliche Raten.

Die Raten der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Bildung aus kernmarkierten FQs entsprechen Mineralisierungsraten für Humus, während der Piperazinrest mit „normaler“ Geschwindigkeit, d.h. wie z.B. Blätter und Gräser [61, 63] abgebaut wird.

Unabhängig von den geschilderten CO<sub>2</sub>-Bildungsraten erfolgt die Umwandlung von FQs in inaktive Metaboliten in Dung und Boden sehr wahrscheinlich innerhalb weniger Monate. Die Intensität der jeweiligen Humifizierungsvorgänge dürfte diesen Prozess entscheidend beeinflussen. So erwähnten Chen et al. bisher unveröffentlichte Daten, nach denen Danofloxacin in 3 Böden innerhalb von etwa 3 bis 5 Monaten zu 50 % transformiert wurde [56]. Ähnliche Werte ergaben sich für die Transformation von Enrofloxacin in Rinderdung [36]. Derartige Aktivitäten sollten eine Akkumulation von FQs im Ackerboden – und damit den sukzessiven Aufbau eines Selektionsdrucks – prinzipiell verhindern.

Den äußerst geringen Raten der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Bildung aus [4-<sup>14</sup>C]-Enrofloxacin in Kuhdung und verrottetem Stroh standen sehr hohe Raten unter optimierten *In-vitro*-Bedingungen bei *Gloeophyllum spp.* und anderen Basidiomyceten gegenüber [36, 39]. Diese Diskrepanz lässt sich vermutlich durch die experimentellen Randbedingungen erklären. Einige der in Abb. 2 gezeigten Metaboliten von Enrofloxacin ähneln bestimmten chinoiden Intermediaten, aus denen im Erdboden die monomeren Bausteine für die nachfolgende Humuspolymerisation gebildet werden. Diese Bausteine entstehen durch Kondensationsreaktionen zwischen Chinonen und Aminen [48, 61, 63]. *In-vitro*-Bedingungen kön-

nen nun so gewählt werden, dass derartige Reaktionen in den Hintergrund gedrängt werden, so z.B. bei der Inkubation von *G. striatum* in Mineralmedium ohne Stickstoffquelle [40]; dann sind hohe  $^{14}\text{CO}_2$ -Bildungsraten möglich. In natürlichen Matrices sind jedoch diverse Amine obligatorisch zugegen, mit denen Metaboliten wie z.B. F-5, F-7 und F-8 (s. Abb. 2) nach oxidativer Aktivierung vermutlich kondensieren; dadurch könnte die  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung zu einer Nebenreaktion werden. Aus diesem Grunde ist es wahrscheinlich nicht möglich, die Abbaubarkeit von FQs in Erdboden und Dung mit einem kernmarkierten Wirkstoff überzeugend darzustellen. Der Abbau von aliphatischen Aminsubstituenten dagegen dürfte von diesen Vorgängen weitgehend unbeeinträchtigt sein. Unter diesen Umständen müsste die eingangs zitierte Rate der  $\text{CO}_2$ -Freisetzung aus [2- $^{14}\text{C}$ ]-Sarafloxacin als „normal“ angesehen werden.

### Verbleibende Fragen und Aussichten

Gegenwärtig steht noch keine Standardmethode zur Analyse von FQ-Resten in natürlichen Matrices zur Verfügung, und Untersuchungen in Dung und Ackerboden bereiten erhebliche analytische Probleme [35, 65]. Trotzdem bilden die bisherigen Erkenntnisse bereits eine Grundlage für zukünftige Feldstudien, aus denen sich allgemeine Modelle zum Umweltverhalten von FQs ableiten lassen sollten. Es bleibt zu prüfen, an welcher Stelle innerhalb der vielfältigen technischen Entsorgungsprozesse für Abwässer, Restschlämme, Mist und Gülle Wirkstoffkonzentrationen auftreten, die ein biologisches Risiko darstellen könnten. Nach der Ermittlung des Wirkstoffgehaltes (unter Erfassung der inaktiven FQ-Konjugate) müsste durch Bindungsstudien mit der jeweiligen Matrix festgestellt werden, wie hoch der biologisch wirksame Anteil und damit der jeweilige Selektionsdruck ist. Käme es *in situ* tatsächlich zur Selektion von FQ-resistenten Klonen humanpathogener Bakterienarten (z.B. von Enterobakterien), wäre deren Überlebensfähigkeit im neuen, kompetitiven Umfeld Ackerboden ein interessanter Parameter. Fragen nach potenziellen (Rück-)Übertragungswegen auf den Menschen, nach der Wahrscheinlichkeit von Erkrankungen und schließlich Einschränkungen der Therapiemöglichkeiten durch eine vorliegende FQ-Resistenz schlossen sich an. Könnte eine entsprechende Sequenz von Ereignissen verhindert werden? Offensichtlich sind zur Abklärung dieser Fragen noch ganz erhebliche Anstrengungen erforderlich.

Bei allen Überlegungen zur Ermittlung von Restrisiken sollten die therapeutischen Erfolge beim Menschen und bei Tieren nicht vergessen werden: Ihr tatsächliches Ausmaß scheint ebenfalls unbekannt zu sein. Im weiten Umfeld von Nutzen-Risiko-Analysen ist der Entwurf von pauschalen Szenarien der Bedrohung des Menschen durch resistente Bakterien aus der Nutztierhaltung [66] lediglich ein Aspekt – wenn auch der „publicity“-trächtigste. Vielen Beteiligten ist klar geworden, dass man durch einen rationalen und verantwortungsvollen Umgang mit FQs der Resistenzselektion entgegen wirken kann [4, 12 – 15, 67]. Nur dann bleiben

die therapeutischen Möglichkeiten erhalten, die durch die FQs – auch in der Veterinärmedizin – eröffnet wurden.

### Zusammenfassung

*FQs wie Enrofloxacin sind biologisch abbaubar. Entsprechende Potenziale finden sich bei Holz-, Dung- und Erdboden bewohnenden Pilzen, Hefen und einigen Bakterienarten, die vermutlich über sehr unterschiedliche Abbaumechanismen verfügen. Bei *Gloeophyllum striatum*, einem Braunfäule verursachenden Basidiomyceten, liegt wahrscheinlich ein Hydroxylradikal-abhängiger Mechanismus vom Fenton-Typ vor. Die Metaboliten von Enrofloxacin haben entweder eine stark verringerte oder keine antibakterielle Aktivität; im Gegensatz zum Wirkstoff sind einige chemisch labil. Die Eliminierung des einzigen naturfremden Strukturelementes, eines aromatisch gebundenen Fluors, erfolgte mit hoher Aktivität. Trotz sehr niedriger  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzungsraten für Markierungspositionen innerhalb des heterocyclischen Moleküllkerns – bei wesentlich höheren Raten für den Aminteil von Enrofloxacin – dürfte es in natürlichen Matrices wie Rinderdung und Ackerböden im Verlauf von Humifizierungsprozessen zu einer relativ schnellen Transformation und Inaktivierung von FQs kommen. Damit ist unwahrscheinlich, dass FQs in Mist und Ackerboden persistieren. Durch unspezifisches Binden an Dung und Ackerböden sowie Faeces und Restschlämme in Kläranlagen wird die Bioverfügbarkeit von FQs drastisch verringert, so dass selbst theoretische worst-case-Konzentrationen in Ackerböden weit unterhalb der Konzentrationen liegen, bei denen ein Selektionsdruck für FQ-Resistenz auftreten könnte.*

**Auf die sehr umfangreiche Literaturliste zum Thema musste die Redaktion aus Platzgründen verzichten; sie ist jedoch auf Anfrage beim Autor erhältlich.**

### Der Autor



Dr. rer. nat. Heinz-Georg Wetzstein (geb. 1952); 1975 – 1980 Biologiestudium an der Universität Göttingen, Abschluss als Diplombiologe, Hauptfach: Mikrobiologie; 1983 Promotion bei Prof. Dr. G. Gottschalk, Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen; 1983 – 1984 DFG-Stipendiat am Institut für Biochemie der Universität Birmingham, England, Arbeitsgruppe Prof. Dr. S. J. Ferguson (Oxford); 1984 – 1988 Laborleiter in der mikrobiologischen Analytik und Qualitätskontrolle im Geschäftsbereich Pharma der Bayer AG; 1988 – 1992 Leiter des analytischen Labors in der Produktion für Veterinärimpfstoffe im Geschäftsbereich Animal Health; seit 1992 Ressort Forschung; Arbeitsgebiete: Antibakterielle Wirkung von Chinolonen und biologischer Abbau von Wirkstoffrückständen in der Umwelt.

### Anschrift

Dr. Heinz-Georg Wetzstein  
Bayer AG  
Animal Health  
Gebäude 6700  
51368 Leverkusen  
Tel.: 02173 38 4882  
Fax: 02173 38 3746  
E-mail: heinz-georg.wetzstein.hw@bayer-ag.de