

Fortschritte in Ökotoxikologie & Umweltchemie *

Antibiotika als Umweltkontaminanten – Effekte auf Bodenbakterien **

Heike Schmitt^{1,2}, Bennie Martinali^{1,2}, Krispin Stoob³, Gerd Hamscher⁴, Patrick van Beelen², Eric Smit², Kees van Leeuwen⁵ und Willem Seinen¹

¹ IRAS, Utrecht University, PO Box 80176, 3508 TD Utrecht, Niederlande

² National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), PO Box 1, 3720 BA Bilthoven, Niederlande

³ EAWAG, Überlandstrasse 133, 8600 Dübendorf, Schweiz

⁴ Institut für Lebensmitteltoxikologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover

⁵ Institute for Health and Consumer Protection, TP 202, 21020 Ispra (Varese), Italien

Korrespondenzautorin (h.schmitt@iras.uu.nl)

DOI: <http://dx.doi.org/10.1065/uwsf2006.04.118>

Zusammenfassung

Ziel und Absicht. Die Umweltauswirkungen des Gebrauchs von Arzneimitteln und insbesondere Antibiotika sind nur unvollständig untersucht. In diesem Beitrag wird ausgewählte Literatur zum Thema besprochen. Weiter wird eine Zusammenfassung von Ergebnissen eigener Arbeiten zu Effekten von Antibiotika in Boden-Mikrokosmen gegeben.

Methoden, Ergebnisse und Schlussfolgerungen. Im Mittelpunkt steht die Methode der 'pollution-induced community tolerance' (PICT), mit der untersucht wird, ob Antibiotika zu Verschiebungen in der Artenzusammensetzung von bakteriellen Gemeinschaften und damit zu einer erhöhten Toleranz der Gemeinschaft führen. Die hier besprochenen PICT-Experimente beruhen auf der Veratmung von organischen Substraten in Multititerplatten (Biolog Platten). Andere besprochene Methoden sind funktionelle Tests, wie die Bodenrespiration, und molekulare Analysen, wie der Nachweis von Resistenzgenen in der DNA der Bodenorganismen. Die Eignung der PICT-Methode als ökotoxikologisches Effektmaß war Gegenstand mehrerer Experimente. Dabei wurde deutlich, dass die Effekttestung von Antibiotika die Gabe von Nährstoffen erfordert, und dass die PICT-Methode Antibiotikaeffekte spezifisch abbilden kann. Mit der PICT-Methode wurden daraufhin die Effekte von drei verschiedenen Antibiotikaklassen untersucht, und bei Konzentrationen von Tetracyclinen, wie sie in der Umwelt auftreten können, erste Effekte festgestellt. Mögliche Risiken des Antibiotikaeinsatzes für die Verbreitung von Antibiotika-Resistenzgenen in der Umwelt sind noch nicht abschliessend zu bewerten, was hauptsächlich an der Rolle des natürlichen Hintergrundes an Resistenzgenen liegt.

Empfehlungen und Ausblick. Die PICT-Methode hat sich durch ihre Spezifität als brauchbare ökotoxikologische Untersuchungsmethode erwiesen. Aufgrund der möglichen Effekte von Tetracyclin-Antibiotika auf die Struktur der Bakteriengemeinschaft wird zu einem vorsichtigen Umgang mit Antibiotika in der landwirtschaftlichen Praxis geraten. Wir empfehlen, die Risiken eines erhöhten Auftretens von Antibiotika-Resistenz in der Umwelt genauer zu untersuchen.

Schlagwörter: Antibiotika; Antibiotika-Resistenz; Bodenmikrobiologie; Ökotoxikologie; Pharmazeutika; Pollution-induced community tolerance (PICT); Tetracyclin

Abstract

Antibiotics as Environmental Pollutants: Effects on Soil Microorganisms

Goal and scope. Among the human and veterinary pharmaceuticals, antibiotics form an important group. Recent research addressed the environmental 'side effects' of antibiotics. Evidence for environmental effects of antibiotics has for example been found for the respiratory activity of soil microorganisms. In the present contribution, results of studies on the ecotoxicology of antibiotics that are based on the utilization of carbon substrates in so-called Biolog plates are summarized.

Methods, Results and Conclusions. The method of pollution-induced community tolerance (PICT) takes centre stage. PICT is based on the changes in community composition of environmental communities brought about by a toxicant, which lead to an overall increase in community tolerance to this toxicant. The suitability of such an increase in community tolerance as ecotoxicological endpoint had been the subject of several experiments. It was shown that effect testing of antibiotics requires supplementation of the communities with nutrients, and that the PICT method reveals antibiotic effects with a high specificity. In an application of PICT, effects of three classes of antibacterial compounds were investigated. Dose-response relationships were obtained for all substances, and effect concentrations were partly in the range of expected environmental concentrations. The possible risks of antibiotic use for an increase in the occurrence of antibiotic resistance genes in the environment are also touched upon, including the extent of natural resistance.

Outlook. Due to its specificity, the PICT method has shown to be a suitable ecotoxicological assay. Due to possible effects of tetracyclines on the structure of the soil microbial community, it is advised to use veterinary antibiotics with caution. The risks of an increase in the occurrence of antibiotic resistance in the environment should be investigated in more detail.

Keywords: Antibiotics; antibiotic resistance; ecotoxicology; pharmaceuticals; Pollution-induced Community Tolerance (PICT); soil microbiology; tetracycline

* In dem neuen Beitragstyp 'Fortschritte in Ökotoxikologie & Umweltchemie' können Befunde aus mehreren eigenen peer reviewed englischsprachigen Originalarbeiten mit einem zusätzlichen internationalen Literaturreview kritisch zusammengefasst und so einem breiteren deutschsprachigen Publikum vorgestellt werden. Dieser Beitragstyp dient insbesondere der Vorstellung kumulativer Doktorarbeiten und der Ergebnisse von größeren Verbundprojekten.

** Dr. Heike Schmitt hat 2005 den mit 3000 Euro dotierten Nachwuchspreis der SETAC-German Language Branch gewonnen (vgl. Karmann et al. 2005, UWSF, 17, 254–255) und wurde eingeladen, auf Grundlage Ihrer kumulativen Promotion den vorliegenden Beitrag zu verfassen.

1 Einleitung

In den letzten Jahren wurden die Effekte von Arzneimitteln in der Umwelt wissenschaftlich intensiv diskutiert (Halling-Sørensen et al. 1998, Kümmerer 2001, Boxall et al. 2004). Die Motivation dafür ist, dass Arzneimittel durch ihre spezifischen Wirkspektren möglicherweise 'Umwelt-Nebenwirkungen' haben. Antibiotika sind dafür ein gutes Beispiel. Bakterien, die Zielorganismen ihrer bioziden Wirkung, kommen nicht nur in der Umwelt vor, sondern spielen dort auch eine zentrale Rolle in vielen Stoffzyklen.

Antibiotika gehören zu den meistgebrauchten Arzneimitteln unter den Veterinärpharmaka. Sie werden in der Tiermedizin zur Vorbeugung und Behandlung von bakteriellen Infektionen eingesetzt. In Ländern mit intensiver Viehhaltung kann die Menge der dort eingesetzten Antibiotika die Größenordnung von Human-Antibiotika erreichen. So wurden im Jahr 2004 in den Niederlanden 9.3 t Sulfonamide in der Veterinärmedizin eingesetzt (VANTURES 2004) – dreimal so viel wie die in der Humanmedizin verwendeten 3.3 t (www.gipdatabank.nl und www.cbg-meb.nl).

Während in der Humanmedizin eingesetzte Antibiotika über Abwasseraufbereitungsanlagen in Oberflächengewässer gelangen können, ist die Hauptroute für den Eintrag von Veterinärantibiotika in die Umwelt das Ausbringen von Gülle mit Antibiotika-Rückständen. Antibiotika wurden bisher in Oberflächengewässern, Kläranlagenabläufen und selbst in Grundwasserproben gefunden, meist in Konzentrationen im Nanogramm / L Bereich (Hirsch et al. 1999, Kolpin et al. 2002, Sacher & Stoks 2003). In Gülle wurden Sulfathiazol-Konzentrationen von bis zu 12.4 mg/kg nachgewiesen (Haller et al. 2002). Zum Eintrag von Antibiotika in Böden liegen wenig Untersuchungen vor – einige Daten zum Abbauverhalten wurden an Feldversuchen mit Antibiotika-angereicherter Gülle gewonnen (Kay et al. 2004). Analysen an Versuchsflächen in Niedersachsen haben gezeigt, dass Tetrazykline bei Begüllung mit Gülle aus der normalen landwirtschaftlichen Praxis in Konzentrationen von mehreren hundert µg/kg vorliegen können (Hamscher et al. 2005) und im Laufe einer Vegetationsperiode nicht vollständig abgebaut werden, so dass jahrelange Anwendung von Tetrazyklinen zur Akkumulation in Böden führen kann (Hamscher et al. 2002).

Die Auswirkungen des Vorkommens von Antibiotika in der Umwelt und besonders in landwirtschaftlichen Böden sind Gegenstand dieses Artikels. Dazu werden neuere Veröffentlichungen zur Ökotoxikologie von Antibiotika in Böden herangezogen. Weiter werden Untersuchungen zusammengefasst, die im Rahmen einer Doktorarbeit an der Universität Utrecht durchgeführt wurden.

Übersichten über das Umweltverhalten und die Ökotoxizität von Arzneimitteln im Allgemeinen sind zu finden bei Halling-Sørensen (1998) und Boxall (2004), ein Boden-spezifisches Review wurde durch Thiele-Bruhn (2003) vorgelegt.

2 Endpunkte im Boden: Bodenfunktionen

Die Boden-Mikrobiologie ist geprägt von einer Vielzahl an möglichen Testsystemen, die über Summenparameter Aussagen über die mikrobielle Aktivität erlauben. Die Testsysteme

lassen sich in funktionelle und strukturelle Tests gruppieren, je nachdem ob eine Bodenfunktion oder die Artenzusammensetzung der Bodenmikroflora Untersuchungsgegenstand ist. Befunde zur Schädigung von Antibiotika liegen nur für wenige Stoffe und Testsysteme vor.

2.1 Effekte auf die Bodenatmung

Relativ gut untersucht ist der Einfluss von Antibiotika auf die Bodenatmung. So fanden Thiele und Beck (2001) eine Reduktion der Substrat-induzierten Bodenatmung durch Sulafapyridin und Oxytetrazyklin bei einem EC10 von 50 beziehungsweise 810 µg/kg (EC50 Werte: 1.17 und 19.1 mg/kg). Sie machten darauf aufmerksam, dass die wachstumshemmende Wirkung der Antibiotika eine Fortsetzung der Testdauer bis ins Wachstumsstadium der Bakterien erfordert. Dies ist ein Beispiel dafür, dass spezifisch wirkende Stoffe eine Anpassung von gängigen Testmethoden erfordern können, um falsch-negative Testresultate zu vermeiden. Eine Hemmung der Glukose-induzierten Bodenatmung wurde auch für Oxytetrazyklin, Tylosin und Sulfachloropyridazin festgestellt (Vaclavik et al. 2004). Die Hemmkonzentrationen (EC50) in Anordnungen, die der OECD-Richtlinie 217 zur Bodenatmung entsprechen, lagen bei 50, 30 und 72 mg/kg. Auch in dieser Studie wurde deutlich, dass klassische Testansätze nicht ohne Probleme auf Antibiotika übertragen werden können. Versuche zum mikrobiellen Abbau von Antibiotika durch Messung der Veratmung der Antibiotika gaben Respirationwerte, die durch den Abbau des Stoffes allein nicht erklärt werden können. Eine mögliche Ursache ist die Schädigung von Teilen der Mikroflora durch die Antibiotika. Dies kann zu einem Anstieg der Respiration führen, weil die toten Bakterien durch andere Mikroorganismen veratmet werden können, was zu einer Überschätzung des mikrobiellen Abbaus führen kann.

In einem Versuch mit Doxyzyklin wurde im Gegensatz zu den oben beschriebenen Untersuchungen kein statistisch signifikanter Effekt des Stoffes auf die Glukose-induzierte Respiration bei gemessenen Bodenkonzentrationen von 10 mg/kg gefunden (Fernández et al. 2004). Auch Tetrazyklin führte nur bei 500 mg/kg zu leichten Reduktionen in der Respirationsleistung, nicht aber bei 50 mg/kg (Hund-Rinke et al. 2004). Die Ursache für diese abweichenden Befunde ist unklar. Es ist möglich, dass Stoff-, Boden- und Testparameter eine Rolle spielen.

2.2 Effekte auf andere Bodenfunktionen

Die Aktivität von Bodenenzymen wird oft als relevante Bodenfunktion angeführt, weil sie mit der Abbauleistung des Bodens in Zusammenhang steht. Bisher liegen Ergebnisse für den Einfluss von Sulfachloropyridazin und Doxyzyklin auf die Phosphatase- und Dehydrogenase-Aktivität vor. Die Resultate waren nicht immer eindeutig. Zum Teil wurde kein Einfluss festgestellt (Doxyzyklin und Dehydrogenase, (Fernández et al. 2004)), oder es wurde abhängig vom Probenahmezeitpunkt eine Aktivierung oder Inhibierung gefunden (Sulfachloropyridazin und Phosphatase, (Boleas et al. 2005)). Untersuchungen zur Aktivität von Dehydrogenase, Phosphatase, und Arylsulfatase sowie der Ammonifikation und Nit-

rifikation werden im Moment im Rahmen des EU-Projektes ERAPharm (Knacker et al. 2005) in unserem Labor durchgeführt. Erste Ergebnisse zeigen, dass das Sulfonamid Sulfamethoxazol in fast allen Assays zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Enzymleistung führt. Die Stärke der Hemmung ist dabei abhängig von der Art des Enzymtestes: Tests, die mit der bakteriellen Biomasse oder der bakteriellen Aktivität korrelieren, reagieren deutlich empfindlicher als extrazelluläre Enzyme. Weiter steigt die Empfindlichkeit der aktivitätskorrelierten Tests durch die zusätzliche Gabe von Nutrienten deutlich an (Meisner et al, unveröffentlichte Ergebnisse).

Ein deutlicher Einfluss von Tetrazyklin- und Sulfonamidantibiotika wurde ebenfalls für den Eisen(III)-Reduktionstest gefunden, der die bakterielle Aktivität widerspiegelt. EC10 Werte in verschiedenen Böden lagen z.T. unterhalb von 100 µg/kg (Thiele-Bruhn 2005).

3 Antibiotika-Effekte auf die Struktur der Bakteriengemeinschaft im Boden

Bodenbakterien zeichnen sich durch eine erstaunliche Vielfalt und Anzahl aus – wahrscheinlich verursacht durch die grosse Heterogenität ihrer Lebensumgebung. Bis zu 10.000 verschiedene Arten Bakterien leben in einem Gramm Boden (Torsvik et al. 1990, Torsvik & Ovreas 2002), und die gesamte Anzahl an Bakterien kann 10^9 pro Gramm Boden erreichen. Diese Diversität kann mit keiner Methode vollständig erfasst werden.

3.1 Molekulare Methoden zur Erfassung der bakteriellen Diversität

Die Isolation von DNA direkt aus der Bodenmatrix ermöglicht den Zugang zu den 90–99% der Bodenbakterien, die mit herkömmlichen Kultivationsmethoden nicht zu untersuchen sind (Amann et al. 1995). Verschiedene Methoden stehen zur Verfügung, um die Diversität der DNA-Fragmente zu analysieren. Zum Einen kann die DNA kloniert und die Zusammensetzung der Gemeinschaft durch Sequenzierung untersucht werden – ein Verfahren, das einen sehr detaillierten Blick auf die bakterielle Flora erlaubt (Schloss & Handelsman 2004), das auf der anderen Seite noch zu aufwändig ist, um in ökotoxikologischen Untersuchungen mit ihrer Vielzahl an Proben eingesetzt zu werden.

Eine grobere und weniger zeitintensive Methode besteht in der Analyse von genetischen 'Fingerprints', z.B. mit der DGGE-Methode (Muyzer 1999). Denaturierende Gradienten-Gel Elektrophorese (DGGE) basiert auf Unterschieden im Schmelzverhalten der bakteriellen 16S rDNA, die für ribosomale RNA kodiert. Im Idealfall repräsentiert eine Bande eine Bakterienart mit ihrem spezifischen Schmelzverhalten. Multivariate Techniken erlauben den Vergleich der Banden-Muster von verschiedenen Proben.

Mit dieser Methode wurden bei einer hohen Konzentration an Tylosin (2000 mg/kg) in Bodenmikrokosmen Veränderungen in der Struktur der bakteriellen Gemeinschaft festgestellt, die noch anhielten, als kein Tylosin mehr im Boden zu detektieren war. Niedrigere Dosen wurden allerdings nicht

untersucht (Westergaard et al. 2001). In eigenen Untersuchungen führte auch Oxytetracyclin zu einer dosisabhängigen Veränderung im DGGE-Muster (Schmitt et al., unveröffentlichte Daten).

3.2 Andere Strukturuntersuchungen: Community-level physiological profiling (CLPP)

Im mikrobiologischen Labor des National Institute for Public Health and the Environment – RIVM (Bilthoven, Niederlande) wird regelmässig eine andere Methode zur Untersuchung von Verschiebungen in der Bakterienstruktur eingesetzt, die unter dem Namen 'community-level physiological profiling' oder CLPP bekannt ist. Diese basiert auf der Messung von Umsatz-Mustern einfacher organischer Substrate durch die Bakteriengemeinschaft. Die Substrate beinhalten u.a. Amine (z.B. Phenylethylamin), Aminosäuren (z.B. L-Asparagin), Kohlenhydrate (D-Cellobiose), und Carboxylsäuren (z.B. 2-Hydroxybenzoesäure). Dabei kommen Mikrotiterplatten mit bis zu 95 gefriergetrockneten Substraten zum Einsatz, die die Veratmung eines Substrates durch die Reduktion eines Tetrazoliumsalses zu einem violetten Farbstoff anzeigen (Biolog 2000). Die Muster verschiedener Proben werden mit multivariaten Analysetechniken verglichen. Die Mikrotiterplatten wurden ursprünglich entwickelt, um Bakterienstämme zu identifizieren. Sie eignen sich jedoch auch zur Untersuchung von bakteriellen Gemeinschaften (Garland & Mills 1991) und wurden von verschiedenen Gruppen eingesetzt, um Unterschiede zwischen kontaminierten und nicht-kontaminierten Proben aufzuzeigen (Knight et al. 1997, Engelen et al. 1998, Röling et al. 2000, Rasmussen & Sørensen 2001, Brandt et al. 2004). Auch in Bodenqualitäts-Monitoringprogrammen werden CLPPs angewandt (Bloem & Breure 2003).

Die CLPP-Methode ist nicht unumstritten (Preston-Mafham et al. 2002) – ein Hauptgrund ist, dass die nährstoffreichen Bedingungen in den Mikrotiterplatten und die langen Inkubationszeiten zur Anreicherung von heterotrophen, schnellwachsenden Bakterien führen (Smalla et al. 1998). Damit ist die Aussagekraft der Respirationsmuster auf einen relativ kleinen Ausschnitt der Bakteriengemeinschaft beschränkt. Diesen Nachteil weisen alle kultur-basierten Methoden auf.

Methodische Probleme bestehen vor allem in der Gewinnung des Inokulums. Da die Substratrespiration von der Anzahl und Aktivität der Bakterien abhängig ist (Garland 1996), ist eine Standardisierung der Inokulumsdichte erforderlich (Haack et al. 1995). Eine am RIVM entwickelte Methode liefert jedoch Muster, die durch die Verwendung von Verdünnungsreihen von der Dichte des Inokulums unabhängig sind (Rutgers et al. 2006).

Die Wirkung von Antibiotika auf CLPP wurde für mehrere Stoffe untersucht. Dazu dienten Mikrokosmos-Experimente, in denen Böden mit Antibiotika und zusätzlichen Nährstoffen angereichert wurden. Dosisabhängige Verschiebungen im Respirationsmuster wurden für Sulfachlorpyridazin (Schmitt et al. 2004), Tylosin, Oxytetracyclin (Schmitt et al, unveröffentlicht) und Tetrazyklin (Schmitt et al. 2006) gefunden. Die Tetrazykline bewirkten meist nur bei sehr hohen Konzentrationen (> 500 mg/kg) Veränderungen im

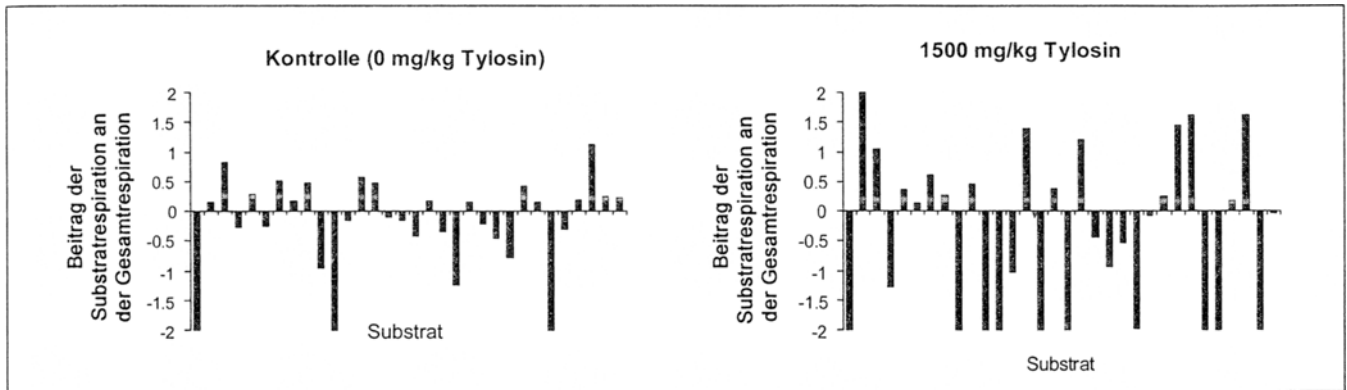


Abb 1: Der Effekt einer hohen Konzentration an Tylosin auf das Community-level physiological profile (CLPP) im Vergleich zu einer Tylosin-unbehandelten Bodenprobe. Jeder Balken auf der X-Achse repräsentiert ein Substrat. Die Y-Achse zeigt den Beitrag der Respiration eines Substrates an der Gesamt-Respiration von Bakterienextrakten in Biolog-Multititerplatten. Die Y-Achse gibt auf logarithmischer Skala an, wann die Veratmung eines Substrates bei schrittweisem Verdünnen des Inokulums im Vergleich zur durchschnittlichen Veratmung aller Substrate reduziert wird. Ein Wert von -2 steht für eine Reduktion der potentiellen Respiration des Substrates bei >100 fachen höheren Inokulum-Dichten als nötig sind, um die durchschnittliche Respiration zu vermindern. Damit gibt eine Verschiebung zu negativeren Werten an, dass ein Substrat durch die Gemeinschaft weniger gut verwendet wird und dass die physiologische Diversität zurückgeht.

Metabolisierungsmuster. Die Verschiebungen durch Tylosin waren ausgeprägter: mit zunehmender Tylosin-Konzentration nahm für viele Substrate schrittweise der Anteil der Bakterien ab, die diese veratmen können. Diese Effekte waren ab 50 mg/kg in multivariaten Analysen sichtbar. Das bedeutet, dass die 'physiologische Diversität' in der Bakteriengemeinschaft (oder jedenfalls im schnellwachsenden Anteil der Gemeinschaft) durch Tylosin abnimmt (Abb. 1).

3.3 Pollution-induced community tolerance (PICT)

3.3.1 PICT als struktureller Test in der Ökotoxikologie

Eine schwedische Gruppe um Hans Blanck schlug vor, die Toleranz einer Organismengemeinschaft für Umweltkontaminanten als Maß für toxische Stoffeffekte einzusetzen (Blanck et al. 1988). Verschiedene Prozesse können dazu führen, dass die Toleranz der Gemeinschaft für einen toxischen Stoff steigt: Toxische Wirkungen können zum Verlust empfindlicher Arten führen. Weiter können Organismen ihre individuelle Toleranz erhöhen, indem sie Reparationsmechanismen aktivieren (Blanck 2002). Die Idee, ein solches Ansteigen der Gesamt-Toleranz als Anzeichen für Stoffverursachte Strukturveränderungen der Gemeinschaft zu werten, bildet die Basis der 'Pollution-induced Community Tolerance' (PICT) Methode. PICT erwies sich z.B. für Untersuchungen von Metall-Effekten als geeignet, und erhöhte Metalltoleranzen konnten in Phytoplanktongemeinschaften und Bodenbakterien nachgewiesen werden (Díaz-Raviña et al. 1994, Rutgers et al. 1998, Soldo & Behra 2000, Blanck et al. 2003, Boivin et al. 2005). Reviews zu PICT finden sich bei Blanck (2002) und Boivin (2002).

Ein Vorteil der PICT-Methode ist ihre Spezifität (Blanck 2002, Boivin et al. 2002): Es ist unwahrscheinlich, dass Umgebungsparameter wie z.B. Temperatur oder Feuchtigkeit die Toleranz einer Gemeinschaft für einen toxischen Stoff deutlich verändern können. Diese Umgebungsvariablen führen jedoch häufig zu Schwankungen in anderen Endpunk-

ten, wie der Biomasse oder Bodenenzymleistungen. Es wird daher angenommen, dass eine steigende Toleranz eine spezifischere Aussage über die Schädwirkung eines Stoffes machen kann als andere ökotoxikologische Endpunkte.

PICT kann sowohl für die Beurteilung von Stoffeffekten im Feld als auch für die Charakterisierung von Effekten in Laborexperimenten verwendet werden. Die Messung von PICT in Labor-Mikrokosmen beruht auf einer zweifachen Exposition. Während der ersten Exposition finden die stoffinduzierten Verschiebungen in der Struktur der Lebensgemeinschaft statt. Diese Expositionphase muss damit lang genug dauern, um Selektion, Sukzession und physiologische Anpassungen zu ermöglichen. Die Toleranztestung, der zweite Schritt, bedient sich meist klassischer Assays wie photosynthetischer Parameter bei Pflanzengemeinschaften oder der Thymidin-Inkorporation bei Bakteriengemeinschaften. Die Toleranz der Gemeinschaften ergibt sich aus der Empfindlichkeit dieser Assays in einem zweiten Stoff-Gradienten.

Das Prinzip der PICT-Testung ist in Abb. 2 für Toleranztestung in Biolog-Platten dargestellt. Bei der Exposition von Boden-Mikrokosmen an Antibiotika (PICT-Selektion) entwickelt sich eine höhere Toleranz bei höheren Antibiotika-Konzentrationen. Bakterielle Extrakte der Mikrokosmen werden in Biolog-Multititerplatten ein zweites Mal an Antibiotika exponiert. Die Antibiotika hemmen das Bakterienwachstum in den Platten. Dadurch sinkt die Veratmung der kohlenstoffhaltigen Substrate, so dass bei ausreichenden Antibiotikakonzentrationen kein als violette Farbentwicklung detektierbarer Umsatz mehr stattfindet. Um die gleiche Reduktion in der Farbentwicklung zu verursachen, sind bei toleranteren Gemeinschaften höhere Antibiotika-Konzentrationen im Toleranzdetektionsschritt erforderlich – ein Hinweis auf erhöhte Toleranz der Gemeinschaft.

Zusammenfassend gibt PICT damit Aufschluss über Veränderungen in der Struktur von Lebensgemeinschaften, die von Toxikanten verursacht werden.

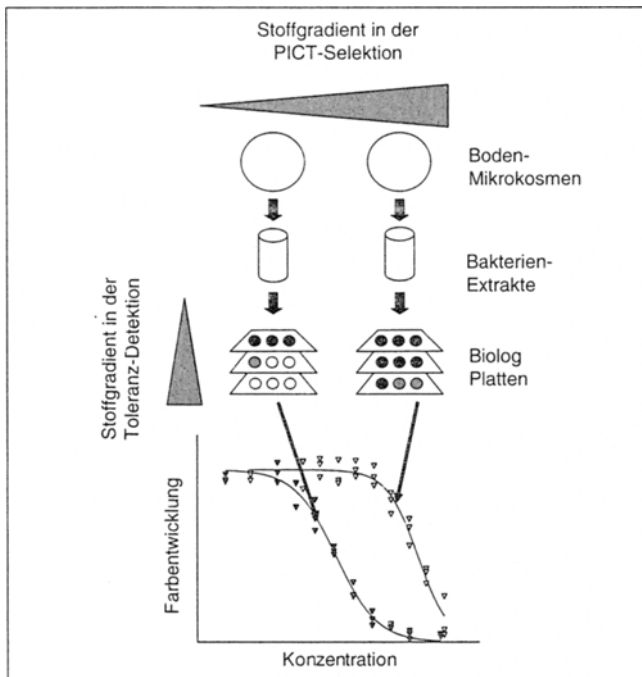


Abb. 2: Testschema für Pollution-induced community tolerance testing (PICT) mit Biolog Multititerplatten. Bodenmikrokosmen werden gegenüber einem Antibiotikum exponiert, wodurch Verschiebungen in der Bakteriengemeinschaft auftreten. Durch die Beeinträchtigung empfindlicherer Arten und physiologische Anpassungen werden exponierte Gemeinschaften als ganzes toleranter gegenüber dem Antibiotikum oder allgemeiner gegenüber dem untersuchten Toxikanten. Die Verschiebung in der Toleranz wird mit Hilfe eines zweiten Stoffgradienten gemessen. Dazu werden aus den Bodenmikrokosmen gewonnene Extrakte in Multititerplatten mit organischen Substraten inokuliert. Die Veratmung der Substrate wird durch eine Redox-Farbreaktion angezeigt, und die Abnahme der Veratmung beim zusätzlichen Spiken der Platten mit Antibiotika in einer Dosis-Wirkungskurve dargestellt. Ein Verschiebung der Dosis-Wirkungskurven zu höheren Konzentrationen zeigt das Ansteigen der Toleranz und damit einen Effekt der Antibiotika auf die Bakteriengemeinschaft an.

3.3.2 Eignung von PICT für die Antibiotikatestung

Auch Antibiotika sind prinzipiell geeignet, um mit der PICT-Methode untersucht zu werden. Mehrere Mechanismen können nämlich dazu beitragen, die Antibiotika-Toleranz einer Bakteriengemeinschaft zu erhöhen: Antibiotika mit einer selektiven Wirkung auf einzelne Bakteriengruppen können zu einem Verschiebung der Zusammensetzung der Gemeinschaft führen. Weiter können Antibiotika dazu führen, dass vorhandene Resistenzgene zur Expression gebracht werden. Resistenzgene sind oft auch zwischen Bakterienarten übertragbar, so dass ursprünglich nicht-resistente Bakterien 'tolerant' werden können. Die Eignung der PICT-Methode für die Effekttestung von Antibiotika war Gegenstand einer Untersuchung mit dem Sulfonamid Sulfachlorpyridazin (Schmitt et al. 2005). Es zeigte sich, dass die Effekte von Antibiotika auf Bodenbakterien erst durch die Gabe von Nutrienten manifest werden – ein Phänomen, das auf dem wachstumshemmenden Effekt vieler Antibiotika und der Nährstofflimitation von Böden beruht. So stieg die Toleranz gegenüber Sulfachlorpyridazin in Sulfachlorpyridazin-gespikten Bodenproben durch die zusätzliche Gabe von frischer Gülle und Alfalfa, während ohne Nutrienten geringere oder gar keine Ef-

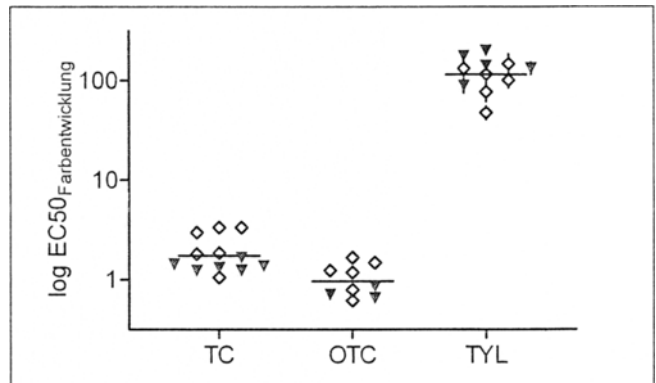


Abb. 3: Reproduzierbarkeit und Varianz von PICT-Toleranztestungen mit Antibiotika und Biolog-Platten. Die Y-Achse zeigt die Hintergrundtoleranz von Bodenproben, die nicht mit Antibiotika behandelt worden waren oder nur geringe Konzentrationen an Antibiotika enthielten. Die Toleranz wird als die Antibiotikakonzentration angegeben, die die Veratmung von organischen Substraten durch Bakterienextrakte in Biolog-Platten auf die Hälfte reduziert (EC50). Die Veratmung wurde anhand der mittleren Fläche unter der Kurve der Farbentwicklung für einzelne Substraten in der Zeit gemessen. Die Toleranz wurde für Tetrazyklin (TC), Oxytetracyklin (OTC) und Tylosin (TYL) untersucht. Offene und geschlossene Symbole sind jeweils Resultate aus unabhängigen Experimenten. Copyright 2006 by Environmental Toxicology & Chemistry / Alliance.com. Reproduced with permission of Environmental Toxicology & Chemistry / Alliance.com

ekte auf die Toleranzentwicklung auftraten. Die Toleranz in Sulfonamid- und Gülle-behandelten Bodenproben zeigte die deutlichsten Effekte: Der mittels der Farbentwicklung in Biologplatten ermittelte EC50-Wert von Boden-Extrakten nahm von 12 (95% CI: 11–14) mg/L auf 60 (50–71) mg/L zu – ein fünffaches Ansteigen der Toleranz. Im Gegensatz dazu variierte die Sulfachloropyridazin-Toleranz von Bodenproben, die zwar Nutrienten, jedoch kein Sulfonamid erhalten hatten, nur wenig (Durchschnitt von 11 Proben: 14.2 mg/L, 95% CI 10.6–16.8 mg/L) (Schmitt et al. 2005). Eine geringe Schwankung der Hintergrunds-Toleranz von Antibiotika-unbehandelten Böden wurde auch für Tetrazyklin, Oxytetracyklin und Tylosin gefunden (Schmitt et al. 2006) – eine Bestätigung der Spezifität der PICT-Methode (Abb. 3).

Diese Spezifität war Untersuchungsgegenstand eines Versuchs zur sogenannten Kotoleranz von Bakteriengemeinschaften (Schmitt et al. 2006). Die Spezifität von PICT und damit die Aussagekraft von Feldstudien hängt davon ab, inwiefern ein Steigen der Toleranz für einen Stoff nicht auch zum Anstieg der Toleranz für andere Stoffe führt (Blanck 2002). Dies ist z.B. denkbar, wenn Toleranzmechanismen die Ausscheidung oder Metabolisierung mehrerer Stoffen beeinflussen können. Kotoleranz wurde für Metalle häufig gefunden, sowohl bei Bodenbakterien als auch bei Periphytongemeinschaften (Díaz-Raviña et al. 1994, Bååth et al. 1998, Soldo & Behra 2000). Von Bakterien ist darüber hinaus bekannt, dass Resistenzmechanismen auf mobilen genetischen Elementen lokalisiert sein können, die Resistenzen für mehrere Antibiotika-Klassen tragen. So kann ein Ansteigen der Häufigkeit von Resistenzgenen einer Klasse auch die Resistenz – oder mit anderen Worten Toleranz – für andere Antibiotika erhöhen.

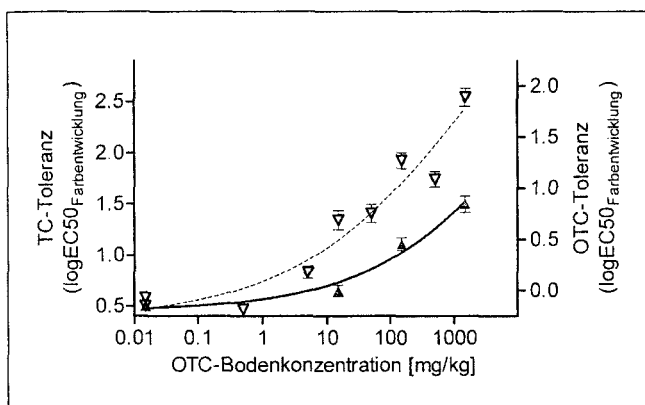


Abb. 4: Kotoleranz von Bakteriengemeinschaften für zwei Tetrazyklin-Antibiotika. Bodenproben wurden gegenüber Oxytetracyklin exponiert, und die Toleranzentwicklung für Oxytetracyklin (rechte Y-Achse, offene Dreiecke) und Tetracyklin (linke Y-Achse, gefüllte Dreiecke) untersucht. Y-Achse: siehe Abb. 3. Copyright 2006 by Environmental Toxicology & Chemistry / Alliance.com. Reproduced with permission of Environmental Toxicology & Chemistry / Alliance.com

Experimentell ergab sich jedoch, dass die mit der PICT-Methode detektierbare Kotoleranz zwischen verschiedenen Antibiotikaklassen vernachlässigbar ist. Tylosin-exponierte Mikrokosmen wiesen nur bei extrem hohen Konzentrationen eine höhere Toleranz für Oxytetracyklin auf, und die Tylosin-Toleranz von Oxytetracyklin-exponierten Mikrokosmen stieg nicht nennenswert. Innerhalb einer Klasse ist Kotoleranz – wie zu erwarten – deutlich sichtbar. So trat ein dosisabhängiger Anstieg der Toleranz gegenüber Tetracyklin in Mikrokosmen auf, die in der PICT-Selektionsphase mit Oxytetracyklin behandelt worden waren (Abb. 4) (Schmitt et al. 2006).

3.3.3 Resultate von PICT- Studien mit Antibiotika

Dosisabhängige PICT-Effekte wurden für mehrere Antibiotika untersucht: Sulfachlorpyridazin, Oxytetracyklin, Tetrazyklin und Tylosin. Eine Übersicht über die untersuchten Stoffe wird in Tab. 1 gegeben. Dabei wurden jeweils Boden-Mikrokosmen verwendet, die mit verschiedenen Dosen an Anti-

Tabelle 1: Physikochemische Eigenschaften, Wirkmechanismus und Resistenzmechanismen der untersuchten Antibiotika

Antibiotika-Klasse und ausgewählte andere Vertreter	Hier untersuchter Stoff	Physikochemische Stoffeigenschaften (Tolls 2001, Blackwell et al. 2004)	Wirkmechanismus	Resistenzmechanismus und Resistenzgene	Strukturformel
Tetrazykline: Tetrazyklin, Chlortetrazyklin, Doxyzyklin, Minozyklin	Oxytetracyklin	CAS: 79-57-2 MW: 460.44 log K _{ow} : -1.22 pK _{a,1} : 3.27 pK _{a,2} : 7.32 pK _{a,3} : 9.11	Blockade der Proteinsynthese durch Hemmung der Assoziation der Aminoacyl-t-RNA mit dem bakteriellen Ribosom (Chopra & Roberts 2001)	Efflux-Pumpen <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>tet(C)</i> , <i>tet(D)</i> , <i>tet(E)</i> , <i>tet(G)</i> , <i>tet(H)</i> , <i>tet(I)</i> , <i>tet(J)</i> , <i>tet(Z)</i> , <i>tet(30)</i> , <i>tet(31)</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>otr(B)</i> , <i>tetP(A)</i> , <i>tet(V)</i> Ribosomale Schutzproteine <i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> , <i>tet(S)</i> , <i>tet(W)</i> , <i>tet(Q)</i> , <i>tet(T)</i> , <i>otr(A)</i> , <i>tetP(B)</i> (Chopra & Roberts 2001)	
Sulfonamide: Sulfamethoxazol, Sulfathiazol, Sulfadiazin, Sulfadimidin	Sulfachlorpyridazin	CAS: 80-32-20 MW: 284.7 log K _{ow} : -0.52 pK _{a,1} : 1.76 pK _{a,2} : 5.71	Blockade der Dihydropteroase, einem Enzym, das zur Folsäureproduktion beiträgt, durch Analogie mit dem Substrat p-Aminobenzoensäure. Folsäure ist ein Koenzym in der Nukleinsäuresynthese (Sköld 2001)	Veränderungen an der Dihydropteroat-Synthese <i>sul(1)</i> , <i>sul(2)</i> , <i>sul(3)</i> , Mutationen im Dihydropteroat-synthase-Gen <i>folP</i> (Sköld 2000, Perreten & Boerlin 2003)	
Makrolide: Erythromycin, Clarithromycin	Tylosin	CAS: 1401-69-0 MW: 916.1 log K _{ow} : 3.5 pK _{a,1} : 7.1	Hemmung der Proteinsynthese durch Bindung an das bakterielle 50S Ribosom und Hemmung der Polypeptid-Translation (Walsh 2003)	Modifikation der 23S rRNA durch Methylierung <i>erm(A)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>erm(C)</i> , <i>erm(D)</i> , <i>erm(E)</i> , <i>erm(F)</i> , <i>erm(G)</i> , <i>erm(H)</i> , <i>erm(I)</i> , <i>erm(N)</i> , <i>erm(O)</i> , <i>erm(Q)</i> , <i>erm(S)</i> , <i>erm(T)</i> , <i>erm(U)</i> , <i>erm(V)</i> , <i>erm(W)</i> , <i>erm(X)</i> , <i>erm(Y)</i> , <i>erm(Z)</i> (Roberts et al. 1999)	

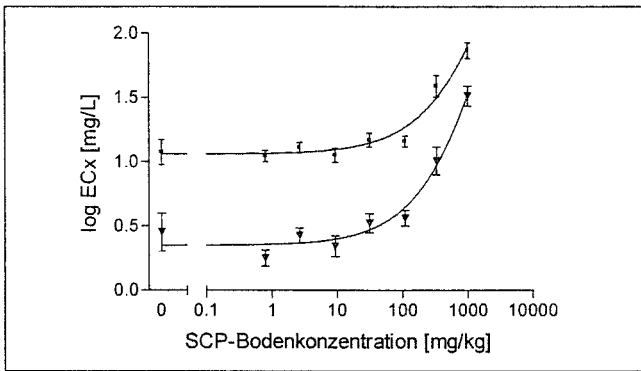


Abb. 5: Effekte von Sulfachlorpyridazin auf die Toleranz von Bodenbakterien. Bodenproben waren gegenüber einem Gradienten von Sulfachlorpyridazin exponiert worden (X-Achse). Y-Achse: siehe Abbildung 3. Dreiecke geben EC25-Werte für die Reduktion der Veratmung durch Sulfachlorpyridazin und ihre mittleren Fehler, Quadrate EC50 Werte. Ein Ansteigen der Hemmkonzentrationen zeigt den Effekt von Sulfachlorpyridazin auf die Bakteriengemeinschaft an. Reprinted with permission from Schmitt H, van Beelen P, Tolls J, van Leeuwen CJ (2004): Pollution-induced community tolerance of soil microbial communities caused by the antibiotic sulfachloropyridazine. *Environ Sci Technol* 38, 1148–1153. Copyright 2005 American Chemical Society

biotika und Gülle angereichert wurden. Alle vier Antibiotika führten zu einem Ansteigen der Toleranz, gemessen als EC50 Werte für die Reduktion der gemittelten Farbentwicklung von Bodenbakterien-Extrakten in Biologplatten. Die Toleranz verdoppelte sich bei Konzentrationen von 183 mg/kg Sulfachlorpyridazin, 58 mg/kg Tylosin, 1,3 mg/kg Oxytetracyclin und 617–861 mg/kg Tetracyclin (Schmitt et al. 2004, Schmitt et al. 2006, Schmitt, unveröffentlichte Daten). Ein Ansteigen der Toleranz um 10% trat bei Konzentrationen von Sulfachlorpyridazin und Tylosin von 11 und 1,3 mg/kg auf (Abb. 5 gibt als Beispiel die PICT-Resultate für Sulfachlorpyridazin).

Die unterschiedlich starken Effekte von Oxytetracyclin und Tetracyclin sind höchstwahrscheinlich weniger auf Unterschiede in der intrinsischen Toxizität oder Physikochemie zurückzuführen als auf experimentelle Unterschiede: Die Nährstoff-Zufügung war auf eine konstante Stickstoff-Zugabe ausgerichtet, was der landwirtschaftlichen Praxis in Stickstoff-empfindlichen Gebieten entspricht. Da der Gehalt an organischer Substanz in den verschiedenen Gülleproben aber nicht mit dem Stickstoffgehalt korreliert war, wurde in den Tetracyclin-Experimenten weniger organischer Kohlenstoff zugefügt als in den Oxytetracyclin-Experimenten, so dass die potentielle Toxizität von Tetracyclin wahrscheinlich unterschätzt wurde. Dies zeigt, dass die Testung von Stoffen mit spezifischen Wirkmechanismen einerseits Veränderungen der Testanordnung erfordern kann (Backhaus et al. 1997, Froehner et al. 2000, Thiele & Beck 2001, Kümmerer et al. 2004), dass die Anpassungen andererseits gut standardisiert werden müssen (Schmitt et al. 2005).

Für Sulfachlorpyridazin stimmen die gefundenen Effekte mit dem physikochemischen Verhalten überein. Aufgrund ihrer relativ geringen Sorption liegen Sulfonamide zu grossen Anteilen im Porenwasser vor (Tolls 2001, Boxall et al. 2002). Anhand des Koc-Wertes können die Gesamtkonzentrationen an Sulfachlorpyridazin in die im Porenwasser gelöste Fraktion umgerechnet werden. Dabei ergeben sich Konzentrationen,

die auch im Biolog-Toleranztest zu Effekten führen (Schmitt et al. 2004). Das ist interessanterweise für Oxytetracyclin, das hohe Sorptions-Gleichgewichtskonstanten aufweist, nicht der Fall: die berechneten Porenwasserkonzentrationen, bei denen ein Anstieg der Toleranz gemessen wurde, sind viel geringer als Effektkonzentrationen im Biolog-Test.

Die Konzentrationen, bei denen die PICT-Methode eine mögliche Beeinträchtigung der Umweltbakterien anzeigt, liegen ungefähr um den Faktor 20 höher als die zu erwarteten Antibiotika-Konzentrationen in landwirtschaftlichen Böden – mit der Ausnahme der Tetracycline. Tetracycline können in landwirtschaftlichen Böden Konzentrationen erreichen, bei denen in unseren Oxytetracyclin-Experimenten ein Toleranzzuwachs von ungefähr 50% auftrat.

4 Antibiotikaresistenz in der Umwelt

Antibiotika als Umweltkontaminanten bringen möglicherweise nicht allein ein Umweltrisiko, sondern auch ein Gesundheitsrisiko mit sich: es kann zu einer Zunahme von antibiotikaresistenten Bakterien kommen. Falls ein vermehrtes Auftreten von resistenten Umweltbakterien auch die Resistenz in Humanpathogenen verstärkt, kann das die Behandlung von bakteriellen Infektionen erschweren. Die Besorgnis über (mehrfach) resistente Pathogene führte schon zu weltweiten Strategieabsprachen (WHO 2001), und auch die Rolle des Antibiotikaeinsatzes in der Veterinärmedizin wird auf internationalem Niveau diskutiert (FAO/OIE/WHO 2003). Die Rolle der Umwelt in der Transmission von Resistenzgenen oder resistenten Bakterien ist bisher jedoch relativ wenig untersucht worden – obwohl mit Gülle grosse Mengen an möglicherweise resistenten Bakterien aus der Intestinalflora von behandelten Tieren in die Umwelt gelangen können (Chee-Sanford et al. 2001, Aminov et al. 2002, Agerso et al. 2004).

Der Selektionsdruck von Antibiotika-Rückständen in Böden wurde daher in denselben Mikrokosmen untersucht, wie sie auch für die PICT-Experimente verwendet wurden. Weiter wurden Bodenproben aus zwei Feldstudien in Deutschland und der Schweiz analysiert, um den Eintrag von Resistenzgenen aus Gülle in landwirtschaftliche Böden zu untersuchen. Mit Methoden der molekularen Mikrobiologie (PCR) wurden Tetracyclin-Resistenzgene in der DNA der Gesamtbakteriengemeinschaft gesucht (Schmitt et al. im Druck).

Die Mikrokosmenstudien zeigten deutlich, dass Gülle als Quelle für Resistenzgene dienen kann. In nicht mit Gülle behandelten Bodenproben wurden 3 der 12 untersuchten Tetracyclin-Resistenzgene gefunden. Gülle aus der Schweinehaltung der Universität Utrecht, in der Tetracycline für die Behandlung von einzelnen erkrankten Tieren eingesetzt werden, enthielt jedoch alle untersuchten Gene. Wurde diese Gülle auf Bodenproben aufgebracht, konnten 6 dieser Gene auch im Boden nachgewiesen werden. Selbst der Selektionsdruck von extrem hohen Antibiotikakonzentrationen (1500 mg/kg) war gegenüber diesem Eintrag von Genen mit der Gülle vernachlässigbar (Schmitt et al. im Druck). Eine Schlussfolgerung ist also, dass der Eintrag von resistenten Bakterien oder Resistenzgenen mit der Gülle wichtiger zu sein scheint als der Eintrag von Antibiotika-Rückständen und eine damit verbundene Resistenzentwicklung im Boden.

Im Gegensatz dazu waren die Resultate der Feldversuche weniger deutlich. Dies lag daran, dass schon in den Bodenproben, die noch nicht begüht worden waren, ähnlich viel Resistenzgene wie in der Gülle nachgewiesen werden konnten. Für die Schweizer Böden war dieses Resultat zunächst verblüffend, weil der Boden zwar regelmässig begüht worden war, nicht jedoch mit Gülle aus der intensiven Schweinehaltung, in der der Antibiotikaeinsatz relativ hoch ist (Schmitt et al. im Druck).

Die Vielfalt an Resistenzgenen in Böden ist jedoch nicht unbedingt überraschend oder besorgniserregend. Es ist bekannt, dass der Boden ein natürliches Reservoir von Resistenzgenen darstellt. Beinahe alle antibakteriellen Wirkstoffe sind vom Ursprung Naturstoffe, die durch Boden-Mikroorganismen wie z.B. Actinomyceten produziert werden. Diese Antibiotikaproduzenten setzen Resistenzmechanismen ein, um sich vor ihren eigenen Stoffwechselprodukten zu schützen. Daher wurde schon vorgeschlagen, im Boden nach neuen Resistenzmechanismen zu suchen, um Trends in der Resistenzentwicklung von Pathogenen früh erkennen zu können (D'Costa et al. 2006).

Der Hintergrund an natürlicher Resistenz ist jedoch nur unzureichend untersucht, was die Beurteilung der Relevanz des Eintrages von Resistenzgenen aus der Viehhaltung in die Umwelt erschwert. Weiter ist anzunehmen, dass der weltweite Einsatz von Antibiotika zu einer weiten Verbreitung von Resistenzgenen beigetragen hat, so dass die Suche nach 'unkontaminierten' Referenzstandorten und Hintergrundwerten für die Antibiotikaresistenz eine schwierige Aufgabe ist. Zuguterletzt ist noch wenig über die Risiken der Aufnahme von Resistenzgenen mit der Nahrung oder durch die Umwelt bekannt. Eine Risikobewertung der Antibiotikaresistenz in der Umwelt scheidet also bisher noch an unzureichenden Daten. Die Rolle der Umwelt in der Verbreitung von Resistenzgenen wird daher weiter Schwerpunkt unserer Untersuchungen bleiben. Laufende Projekte untersuchen den Eintrag von Resistenzen aus landwirtschaftlichen Böden in Oberflächengewässer, und beziehen auch kultivierbare Pathogene und opportunistische Bakterien mit ein.

5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Methodologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die PICT-Methode ein stabiler und spezifischer ökotoxikologischer Endpunkt für die Testung von Antibiotika sein kann. Darüberhinaus zeigten PICT-Analysen, dass Antibiotika z.T. bei umweltrelevanten Konzentrationen Effekte auf Bodenbakterien haben können. Der Einfluss der Antibiotikaawendung auf die Zunahme von Antibiotikaresistenzen bei Pathogenen erfordert weitere Untersuchungen. Es wurde jedoch deutlich, dass Gülle eine Quelle von Antibiotika-Resistenzgenen darstellen kann. Es wird daher abschliessend zu einem vorsichtigen Umgang mit Antibiotika in der Viehzucht geraten. Dabei können Leitlinien für den Einsatz von Antibiotika eine wichtige Rolle spielen. Ein Beispiel mit allgemeinen Empfehlungen und Mindestanforderungen zum Antibiotikaeinsatz stellen die 'Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln' (Anonymus 2000), die von der Bundestierärztekammer und der Arbeitsgemeinschaft der Leitenden Veterinärbeamten erstellt wurden, dar.

Danksagung. Diese Arbeit wurde zum Teil durch die Europäische Union finanziert (ERAVMIS, EVKT1-CT-1999-00003). Mein Dank gilt den Studenten, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Danken möchte ich auch den Betreuern der Doktorarbeit, die dieser Publikation zugrunde liegt: Patrick van Beelen und Eric Smit am National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) in Bilthoven, sowie Willem Seinen am Institute for Risk Assessment Sciences der Universität Utrecht und Kees van Leeuwen. Zuguterletzt möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen an die SETAC German Language Branch für die Verleihung des Nachwuchspreises.

Literatur

- Anonymus (2000): Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln – Mit Erläuterungen, Bundestierärztekammer (BTK), Arbeitsgemeinschaft der Leitenden Veterinärbeamten (ArGeVet)
- Agersø Y, Sengeløv G, Jensen LB (2004): Development of a rapid method for direct detection of tet(M) genes in soil from Danish farmland. *Environ Int* 30, 117–122
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59, 143–169
- Aminov RI, Chee-Sanford JC, Garrigues N, Teferedegne B, Krapac IJ, White BA, Mackie RI (2002): Development, validation, and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of gram-negative bacteria. *Appl Environ Microb* 68, 1786–1793
- Bååth E, Díaz-Raviña M, Frostegård Å, Campbell C (1998): Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Appl Environ Microb* 64, 238–245
- Backhaus T, Froehner K, Altenburger R, Grimme LH (1997): Toxicity testing with *Vibrio fischeri*: A comparison between the long term (24 h) and the short term (30 min) assay. *Chemosphere* 12, 2925–2938
- Biolog (2000): Biolog eco plate – Microbial community analysis. Biolog, Hayward
- Blackwell PA, Lützhof HC, Ma HP, Halling-Sørensen B, Boxall A, Kay P (2004): Fast and robust simultaneous determination of three veterinary antibiotics in groundwater and surface water using a tandem solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography-UV detection. *J Chromatogr A* 1045, 111–117
- Blanck H (2002): A critical review of procedures and approaches used for assessing pollution-induced community tolerance (PICT) in biotic communities. *Hum Ecol Risk Assess* 8, 1003–1034
- Blanck H, Admiraal W, Cleven RF, Guasch H, van den Hoop MA, Ivorra N, Nyström B, Paulsson M, Petterson RP, Sabater S, Tubbing GM (2003): Variability in zinc tolerance, measured as incorporation of radio-labeled carbon dioxide and thymidine, in periphyton communities sampled from 15 European river stretches. *Arch Environ Contam Toxicol* 44, 17–29
- Blanck H, Wängberg S-Å, Molander S (1988): Pollution-induced community tolerance – A new ecotoxicological tool. In: Cairns J, Pratt JR (Hrsg), Functional testing of aquatic biota for estimating hazards of chemicals, Vol STP 988. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA, 219–230
- Bloem J, Breure AM (2003): Microbial indicators. In: Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG (Hrsg), Bioindicators and biomonitors, Vol 6. Elsevier, Amsterdam, 259–282
- Boivin M-E, Breure AM, Posthuma L, Rutgers M (2002): Determination of field effects of contaminants – Significance of pollution-induced community tolerance. *Hum Ecol Risk Assess* 8, 1035–1055
- Boivin M-E, Massieux B, Breure AM, van den Enden FP, Greve GD, Rutgers M, Admiraal W (2005): Effect of copper and temperature on aquatic bacterial communities. *Aquat Toxicol* 71, 345–356
- Boleas S, Alonso C, Pro J, Babin MM, Fernandez C, Carbonell G, Tarazona JV (2005): Effects of sulfachlorpyridazine in MS3-arable land: A multispecies soil system for assessing the environmental fate and effects of veterinary medicines. *Environ Toxicol Chem* 24, 811–819
- Boxall AB, Fogg LA, Blackwell PA, Kay P, Pemberton EJ, Croxford A (2004): Veterinary medicines in the environment. *Rev Environ Contam Toxicol* 180, 1–91
- Boxall ABA, Blackwell P, Cavallo R, Kay P, Tolls J (2002): The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. *Toxicol Lett* 131, 19–28
- Brandt KK, Jørgensen NOG, Nielsen TH, Winding A (2004): Microbial community-level toxicity testing of linear alkyl sulfonates in aquatic microcosms. *FEMS Microbiol Ecol* 49, 229–241

- Chee-Sanford JC, Aminov RI, Krapac IJ, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI (2001): Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Appl Environ Microb* 67, 1494–1502
- Chopra I, Roberts M (2001): Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 232–260
- D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD (2006): Sampling the antibiotic resistome. *Science* 311, 374–377
- Díaz-Raviña M, Bååth E, Frostegård Å (1994): Multiple heavy metal tolerance of soil bacterial communities and its measurement by a thymidine incorporation technique. *Appl Environ Microb* 60, 2238–2247
- Engelen B, Meinken K, von Wintzingerode F, Heuer H, Malkomes H-P, Backhaus H (1998): Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Appl Environ Microb* 64, 2814–2821
- FAO/OIE/WHO (2003): Second Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Management options, FAO/OIE/WHO, Geneva
- Fernández C, Alonso C, Babin MM, Pro J, Carbonell G, Tarazona JV (2004): Ecotoxicological assessment of doxycycline in aged pig manure using multispecies soil systems. *Sci Total Environ* 323, 63–69
- Froehner K, Backhaus T, Grimme LH (2000): Bioassays with *Vibrio fischeri* for the assessment of delayed toxicity. *Chemosphere* 40, 821–828
- Garland JL (1996): Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil Biol Biochem* 28, 213–221
- Garland JL, Mills AL (1991): Classification and characterisation of heterotrophic microbial communities on the basis of pattern of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl Environ Microb* 57, 2351–2359
- Haack SK, Garchow H, Klug MJ, Forney LJ (1995): Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Applied environmental microbiology* 61, 1458–1468
- Haller MY, Müller SR, McArdell CS, Alder AC, Suter MJ-F (2002): Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography – Mass spectrometry. *J Chrom A* 952, 111–120
- Halling-Sørensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützhøft HC, Jørgensen SE (1998): Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the Environment – A review. *Chemosphere* 36, 357–393
- Hamscher G, Pawelzick HT, Höper H, Nau H (2005): Different behaviour of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environ Toxicol Chem* 24, 861–868
- Hamscher G, Sczesny S, Höper H, Nau H (2002): Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 74, 1509–1518
- Hirsch R, Ternes T, Haberger K, Kratz K-L (1999): Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment* 225, 109–118
- Hund-Rinke K, Simon M, Lukow T (2004): Effects of tetracycline on the soil microflora: Function, diversity, resistance. *JSS – J Soils & Sediments* 4, 11–16
- Kay P, Blackwell PA, Boxall AB (2004): Fate of veterinary antibiotics in a macroporous tile drained clay soil. *Environ Toxicol Chem* 23, 1136–1144
- Knacker T, Duis K, Ternes T, Fenner K, Escher B, Schmitt H, Römbke J, Garric J, Hutchinson T, Boxall ABA (2005): The EU-project ERA-Pharm. Incentives for the further development of guidance documents? *ESPR – Environ Sci & Pollut Res* 12, 62–65
- Knight BP, McGrath S, Chaudri AM (1997): Biomass carbon measurements and substrate utilization patterns of microbial populations from soils amended with cadmium, copper, or zinc. *Appl Environ Microb* 63, 39–43
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT (2002): Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: A national reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36, 1202–1211
- Kümmerer K (2001) *Pharmaceuticals in the environment: Sources, fate, effects and risks*, Vol. Springer-Verlag, Berlin
- Kümmerer K, Alexy R, Hüttig J, Schöll A (2004): Standardized tests fail to assess the effects of antibiotics on environmental bacteria. *Water Res* 38, 2111–2116
- Muyzer G (1999): DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 2, 317–322
- Perreten V, Boerlin P (2003): A new sulfonamide resistance gene (sul3) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 1169–1172
- Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson PF (2002): Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles – A critique. *FEMS Microbiol Ecol* 42, 1–14
- Rasmussen LD, Sørensen SJ (2001): Effects of mercury contamination on the culturable heterotrophic, functional and genetic diversity of the bacterial community in soil. *FEMS Microbiol Ecol* 36, 1–9
- Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H (1999): Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide Streptogramin B Resistance Determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 2823–2830
- Röling WFM, van Breukelen BM, Braster M, Goeltom MT, Groen J, van Verseveld HW (2000): Analysis of microbial communities in a landfill leachate polluted aquifer using a new method for anaerobic physiological profiling and 16S rDNA based fingerprinting. *Microb Ecol* 40, 177–188
- Rutgers M, Breure AM, Insam H (2006): 8.4. Substrate utilisation in Biolog plates for analysis of CLPP. In: Bloem J, Hopkins DW, Benedetti A (Hrsg), *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*. CAB International, Wallingford, UK, pp 212–227
- Rutgers M, van't Verlaat IM, Wind B, Posthuma L, Breure AM (1998): Rapid method for assessing pollution-induced community tolerance in contaminated soil. *Environ Toxicol Chem* 17, 2210–2213
- Sacher F, Stoks PG (2003): *Pharmaceutical residues in waters in the Netherlands*. Report No. ISBN: 90-6683-106-5, RIWA – Vereniging van Rivierwaterbedrijven, Nieuwegein
- Schloss PD, Handelsman J (2004): Status of the Microbial Census. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 686–691
- Schmitt H, Haapakangas H, van Beelen P (2005): Effects of antibiotics on soil microorganisms: Time and nutrients influence pollution-induced community tolerance. *Soil Biol Biochem* 37, 1882–1892
- Schmitt H, Martinali B, van Beelen P, Seinen W (2006): On the limits of toxicant-induced tolerance testing: co-tolerance and response variation of antibiotic effects. *Environmental Toxicology & Chemistry* 25, in press
- Schmitt H, Sroob K, Hamscher G, Smit E, Seinen W (im Druck): Tetracyclines and tetracycline resistance in agricultural soils – Microcosm and field studies. *Microb Ecol*
- Schmitt H, van Beelen P, Tolls J, van Leeuwen CJ (2004): Pollution-induced community tolerance of soil microbial communities caused by the antibiotic sulfachloropyridazine. *Environ Sci Technol* 38, 1148–1153
- Sköld O (2000): Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates* 3, 155–160
- Sköld O (2001): Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary Research* 32, 261–273
- Smalla K, Wachtendorf U, Heuer H, Liu W-T, Forney L (1998): Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl Environ Microb* 64, 1220–1225
- Soldo D, Behra R (2000): Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver. *Aquat Toxicol* 47, 181–189
- Thiele S, Beck I-C (2001): Wirkungen pharmazeutischer Antibiotika auf die Bodenmikroflora – Bestimmung mittels ausgewählter bodenbiologischer Testverfahren. *Mitteilungen der deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft* 96, 383–384
- Thiele-Bruhn S (2003): Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – A review. *J Plant Nutr Soil Sci* 166, 145–167
- Thiele-Bruhn S (2005): Microbial inhibition by pharmaceutical antibiotics in different soils – Dose-response relations determined with the iron(III) reduction test. *Environ Toxicol Chem* 24, 869–876
- Tolls J (2001): Sorption of veterinary pharmaceuticals – A review. *Environ Sci Technol* 35, 3397–2406
- Torsvik V, Goksøyr J, Daae FL (1990): High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microb* 56, 782–787
- Torsvik V, Ovreas L (2002): Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 5, 240–245
- Vaclavik E, Halling-Sørensen B, Ingerslev F (2004): Evaluation of manometric respiration tests to assess the effects of veterinary antibiotics in soil. *Chemosphere* 56, 667–676
- VANTURES (2004): MARAN-2004 – Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals in The Netherlands in 2004, VANTURES, The Hague
- Walsh C (2003) *Antibiotics: Actions, origins, resistance*. ASM Press, Washington DC
- Westergaard K, Müller AK, Christensen S, Bloem J, Sørensen SJ (2001): Effects of tylosin as a disturbance on the soil microbial community. *Soil Biol Biochem* 33, 2061–2071
- WHO (2001): *Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance*. Report No. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2a, World Health Organisation

Eingegangen: 22. März 2006
 Akzeptiert: 09. April 2006
 OnlineFirst: 10. April, 2006