



Rückgang der PFC-Belastung in kommunalen Klärschlamm in Bayern

Hanna Ulrich (Hanna.Ulrich@lfu.bayern.de), Korbinian Freier (Korbinian.Freier@lfu.bayern.de), Thomas Meierfels (Thomas.Meierfels@lfu.bayern.de), Arnold Rupprich (Arnold.Rupprich@lfu.bayern.de), Michael Gierig (Micheal.Gierig@lfu.bayern.de)

Zusammenfassung

Die bodenbezogene Verwertung von Klärschlamm kann eine Umweltbelastung mit per- und polyfluorierten Chemikalien (PFC) verursachen. Deshalb müssen in Bayern seit 2008 alle derartigen Klärschlämme auf PFC untersucht und bei Überschreitungen des Vorsorgewerts von 125 µg/kg TM thermisch verwertet werden. Von 2008 bis 2013 wurden insgesamt 4981 Klärschlammproben aus 1165 kommunalen Kläranlagen auf PFC untersucht. In diesem Zeitraum überschritten 71 Anlagen mindestens einmal den Vorsorgewert, mit rückläufiger Tendenz. Bei knapp der Hälfte aller untersuchten Kläranlagen nahm die PFC-Belastung ab, für 16 % musste jedoch ein zunehmender Trend verzeichnet werden. Insgesamt konnte von 2008 bis 2013 die PFC-Freisetzung über Klärschlamm um 90 % verringert werden.

1. Einleitung

Per- und polyfluorierte Chemikalien (PFC, engl. per- and polyfluoroalkyl substances PFASs) stellen aufgrund ihrer teils persistenten, toxischen und bioakkumulativen Wirkung eine Gefahr für Mensch und Umwelt dar (Lau et al., 2007). Langkettige PFC, insbesondere PFOS und zunehmend auch PFOA, wurden daher in den vergangenen Jahren auf nationaler und internationaler Ebene in ihrem Einsatz stark reglementiert (Wang et al., 2013; EU, 2006; EU, 2010).

In das Abwasser und damit in kommunale Kläranlagen (KA) gelangen PFC über Indirekteinleitung der Industrie oder durch Freisetzung aus Produkten, die PFC enthalten (Boulanger et al., 2005; Prevedouros et al., 2006; Schultz et al., 2006; Sinclair et al., 2006). Aufgrund ihrer hohen Persistenz werden PFC während des Klärprozesses so gut wie nicht abgebaut und adsorbieren entweder am Klärschlamm oder werden über das gereinigte Abwasser in die Oberflächengewässer eingeleitet (Schultz et al., 2006; Huset et al., 2008; Guerra et al., 2014). Aufgrund ihrer höheren Sorptionsneigung werden überwiegend die langkettigen PFC-Verbindungen an den Klärschlamm gebunden (Sun et al., 2011; Zhang et al., 2013). Wird belasteter Klärschlamm bodenbezogen verwertet, können Grundwasser oder angrenzende Oberflächengewässer durch ausgewaschene PFC verunreinigt werden (Ahrens, 2011). Um eine derartige Freisetzung in die Umwelt zu verhindern, müssen in Bayern seit 2008 alle Klärschlämme von KA mit einer Ausbaugröße ab 1000 Einwohnerwerten (EW) auf PFC untersucht werden. Wird dabei eine Überschreitung des Vorsorgewerts von 125 µg/kg TM nachgewiesen (100 µg/Kg TM zuzüglich 25 % Messtoleranz), muss der Schlamm thermisch entsorgt werden.

Die grundlegende Forschungsfrage dieser Arbeit ist es, anhand der umfassenden Daten von PFC in bayerischen Klärschlamm einen zeitlichen Trend der Belastung zu bestimmen und zu erfassen, wie effektiv die nationalen und internationalen Beschränkungen und Verbote die Freisetzung von PFC in die Umwelt reduziert haben.

2. Material und Methoden

Die Probenahme erfolgte durch die KA-Betreiber nach der Abfallklärschlammverordnung (AbfKlärV, 1992) und die Analytik der PFC im Klärschlamm nach DIN 38414-14. Folgende elf Einzelverbindungen wurden bestimmt: Perfluorhexansäure (PFHxA), Perfluorheptansäure (PFHpA), Perfluoroctansäure (PFOA), Perfluorononansäure (PFNA), Perfluordecansäure (PFDA), Perfluordodecansäure (PFDoA), Perfluorbutansulfonsäure (PFBS), Perfluorhexansulfonsäure (PFHxS), Perfluoroctansulfonsäure (PFOS), Perfluordecansulfonsäure (PFDS), Perfluoroctansulfonamid (PFOSA). Bei der PFC-Summenbildung aus diesen Verbindungen werden nur Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze (NG) von 10 µg/kg TM berücksichtigt.

Von 2008 bis 2013 wurden insgesamt 4981 Klärschlammproben aus 1165 verschiedenen kommunalen KA auf PFC untersucht. Damit liegt für 85 % aller bayerischen kommunalen KA mit einer Ausbaugröße ab 1000 EW mindestens eine PFC-Untersuchung im Klärschlamm vor.

3. Ergebnisse und Diskussion

Alle untersuchten PFC konnten in den Klärschlammproben in Konzentrationen größer der NG detektiert werden. Am häufigsten wurden PFOS (43 % der Klärschlammproben), PFDA (20 %), PFOA (7 %) und PFDoA (5 %) nachgewiesen. Die Dominanz von PFOS entspricht Ergebnissen anderer Studien (Higgins et al., 2005; Bossi et al., 2008; Guo et al., 2010; Sun et al., 2011; Alder et al., 2015). Die Maximalkonzentration für PFOS betrug dabei 7600 µg/kg TM, für PFDA 597 µg/kg TM, für PFOA 1043 µg/kg TM und für PFDoA 325 µg/kg TM.

Im gesamten Untersuchungszeitraum überschritten 71 KA den PFC-Vorsorgewert mindestens einmal, allerdings mit rückläufiger Tendenz: Im Jahr 2008 überschritten 39 der untersuchten KA (5,7 %) den Vorsorgewert, 2013 nur mehr 6 (0,8%). Der Anteil unbelasteter KA stieg dagegen von 33% (2008) auf 65% (2013) an. Dies scheint eine abnehmende Belastung der Klärschlämme anzudeuten. Allerdings kann bei diesen Zahlen nicht ausgeschlossen werden, dass es sich nur um einen scheinbaren Trend handelt, denn KA-Betreiber mit Überschrei-

tungen könnten sich dazu entschlossen haben, ihre Klärschlämme nach einer einmaligen Überschreitung prinzipiell thermisch zu entsorgen, wodurch sie nicht mehr gezwungen gewesen wären, die PFC-Konzentrationen zu bestimmen.

Die Verteilung der Daten bezüglich Konzentrationsbereiche ließ es nicht zu, einen einheitlichen Trend über alle Datenpunkte mittels Regression zu erfassen. Daher wurde für insgesamt 729 KA des Datensatzes (63 %) jeweils eine gesonderte Regressionsanalyse in Bezug auf die PFC-Summe durchgeführt. Alle übrigen KA konnten nicht in diese Untersuchung mit einbezogen werden, weil sie entweder nur einmalig beprobt wurden (9 %) oder keine nachweisbaren PFC im Klärschlamm enthielten (28 %).

Die ermittelten Steigungen der Regressionsanalysen zeigen eine starke Häufung von abnehmenden Trends um $-10 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{a})$ bei gleichzeitiger großer Streuung. Abbildung 1 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Steigungen im Wertebereich von -50 bis $+50 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{a})$. Verwendet man nur Steigungen aus Regressionsanalysen mit einem Bestimmtheitsmaß von größer 0,5 und mit mindestens drei Werten, so bleibt die Form der Häufigkeitsverteilung in etwa identisch (nicht abgebildet) und kann somit als statistisch robust betrachtet werden.

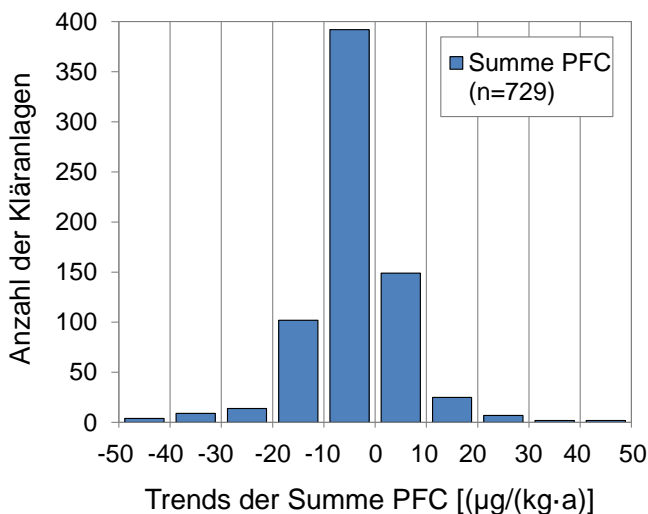


Abb. 1: Häufigkeitsverteilung der Trends (Steigung der Regressionsgeraden) der PFC-Summen aller Anlagen, für die Regressionen berechnet wurden.

In der Summe zeigen 540 der mittels Regressionsanalyse untersuchten KA abnehmende PFC Konzentrationen (das entspricht 47 % aller KA im gesamten Datensatz). 189 KA (16 %) weisen dagegen eine zunehmende Konzentration auf, vor allem im Bereich niedriger Konzentrationen. Es bestand der Verdacht, dass diese Zunahmen durch die verstärkte Verwendung von nicht-reglementierten PFC erklärt werden könnten. Regressionsanalysen der einzelnen Substanzen (nicht abgebildet) erhärteten diesen Verdacht jedoch nicht, stattdessen waren innerhalb des Datensatzes auch für die regulierten Substanzen PFOS und PFOA Zunahmen auf niedrigem Niveau zu beobachten.

Abschließend wurden die potentiellen PFC-Frachten, die über die Klärschlammausbringung in die Umwelt freigesetzt werden können, für alle untersuchten KA berechnet. Da für die einzelnen KA keine jährlichen Klärschlammmengen vorlagen, wurde für die Berechnung der Jahresfrachten die durchschnittliche bayerische Klärschlammmenge pro Einwohnerwert herangezogen ($10,4 \text{ kg}/(\text{EW}\cdot\text{a})$). Zur Berechnung der Fracht wurde dieser Wert mit der PFC-Konzentration und dem EW der jeweiligen KA multipliziert. In der Annahme, dass die PFC-Fracht in den Jahren vor Beginn der regulierenden Maßnahmen mindestens so hoch waren, wie im ersten Untersuchungsjahr 2008, konnte die durch bodenbezogene Verwendung von Klärschlämmen freigesetzte PFC-Menge insgesamt um mehr als 90 % verringert werden (von 17 t/a 2008 auf $1,5 \text{ t/a}$ 2013). Über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg konnte in der Summe die Freisetzung von 28 t PFC in die Umwelt vermieden werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie verdeutlichen, dass die PFC-Konzentrationen im Klärschlamm kommunaler KA deutlich zurückgegangen sind. Dies kann zum einen auf regulatorische Maßnahmen zurückgeführt werden, die in den letzten Jahren für PFOS bereits umgesetzt wurden und für langkettige perfluorierte Carbonsäuren (PFCA) in Arbeit sind. Zum anderen konnte durch die Einführung des Vorsorgewerts bei einer beabsichtigten bodenbezogenen Verwertung von Klärschlamm (mit thermischer Verwertung bei Überschreitung) die PFC-Emission stark verringert werden.

4. Fazit und Ausblick

Abschließend kann für den Untersuchungszeitraum festgestellt werden, dass die Beschränkungen und Regulierungen auf nationaler und internationaler einen deutlichen Rückgang der PFC-Belastung im Klärschlamm bewirkt haben. Die Ursache für die zunehmende PFC-Konzentration im Klärschlamm bestimmter KA konnte nicht geklärt werden. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig.

Mit der vorliegenden Auswertung kann keine generelle Aussage zur PFC-Belastung im Abwasser getroffen werden. Denn langkettige PFC-Verbindungen werden in den letzten Jahren zum einen durch kurz-kettige Verbindungen ersetzt, die in deutlich geringerem Umfang an Klärschlamm adsorbieren. Zum anderen werden zahlreiche unbekannte polyfluorierte Verbindungen als Substitute eingesetzt, die mit dem gängigen PFC-Analytikspektrum nicht erfasst werden. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Gesamtbelastung durch PFC im Abwasser in den vergangenen Jahren eventuell sogar zugenommen hat.

Literatur

- AbfKlärV (1992). Klärschlammverordnung.
- Ahrens, L. (2011). Polyfluoroalkyl compounds in the aquatic environment: a review of their occurrence and fate. *J. Environ. Monit.* 13 (1): 20-31. 10.1039/c0em00373e
- Alder, A. C. and J. van der Voet (2015). Occurrence and point source characterization of perfluoroalkyl acids in sewage sludge. *Chemosphere* 129 (0): 62-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.045>
- Bossi, R., J. Strand, O. Sortkjær, and M. M. Larsen (2008). Perfluoroalkyl compounds in Danish wastewater treatment plants and aquatic environments. *Environ. Int.* 34 (4): 443-450. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2007.10.002>
- Boulanger, B., J. D. Vargo, J. L. Schnoor, and K. C. Hornbuckle (2005). Evaluation of Perfluorooctane Surfactants in a Wastewater Treatment System and in a Commercial Surface Protection Product. *Environ. Sci. Technol.* 39 (15): 5524-5530. 10.1021/es050213u
- DIN 38414-14:2011-08 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Schlamm und Sedimente (Gruppe S) - Teil 14: Bestimmung ausgewählter polyfluorierter Verbindungen (PFC) in Schlamm, Kompost und Boden - Verfahren mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS/MS) (S 14)
- EU (2006). Directive 2006/122/EC of 12 December 2006 amending for the 30th time Council Directive 76/769/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (perfluorooctane sulfonates). *Official Journal of the European Union*: L 372/32-L /34, European Parliament and the Council of the European Union.
- EU (2010). Commission Regulation (EU) No 757/2010 of 24 August 2010 amending Regulation (EC) No 850/2004 of the European Parliament and of the Council on persistent organic pollutants as regards Annexes I and III. L 223/29-L /36 European Parliament and the Council of the European Union.
- Guerra, P., M. Kim, L. Kinsman, T. Ng, M. Alaei, et al. (2014). Parameters affecting the formation of perfluoroalkyl acids during wastewater treatment. *J. Hazard. Mater.* 272: 148-154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.03.016>
- Guo, R., W.-J. Sim, E.-S. Lee, J.-H. Lee, and J.-E. Oh (2010). Evaluation of the fate of perfluoroalkyl compounds in wastewater treatment plants. *Water Res* 44 (11): 3476-3486.
- Higgins, C. P., J. A. Field, C. S. Criddle, and R. G. Luthy (2005). Quantitative determination of perfluorochemicals in sediments and domestic sludge. *Environ. Sci. Technol.* 39 (11): 3946-3956. 10.1021/es048245p
- Huset, C. A., A. C. Chiaia, D. F. Barofsky, N. Jonkers, H.-P. E. Kohler, et al. (2008). Occurrence and mass flows of fluorochemicals in the Glatt Valley watershed, Switzerland. *Environ. Sci. Technol.* 42 (17): 6369-6377. 10.1021/es703062f
- Lau, C., K. Anitole, C. Hodes, D. Lai, A. Pfahles-Hutchens, et al. (2007). Perfluoroalkyl acids: A review of monitoring and toxicological findings. *Toxicol. Sci.* 99 (2): 366-394. 10.1093/toxsci/kfm128
- Prevedouros, K., I. T. Cousins, R. C. Buck, and S. H. Korzeniowski (2006). Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. *Environ. Sci. Technol.* 40 (1): 32-44. 10.1021/es0512475
- Schultz, M. M., C. P. Higgins, C. A. Huset, R. G. Luthy, D. F. Barofsky, et al. (2006). Fluorochemical mass flows in a municipal wastewater treatment facility. *Environ. Sci. Technol.* 40 (23): 7350-7357. 10.1021/es061025m
- Sinclair, E. and K. Kannan (2006). Mass loading and fate of perfluoroalkyl surfactants in wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Technol.* 40 (5): 1408-1414. 10.1021/es051798v
- Sun, H., A. C. Gerecke, W. Giger, and A. C. Alder (2011). Long-chain perfluorinated chemicals in digested sewage sludges in Switzerland. *Environ. Pollut.* 159 (2): 654-662. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2010.09.020>
- Wang, Z., I. T. Cousins, M. Scheringer, and K. Hungerbühler (2013). Fluorinated alternatives to long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCAs), perfluoroalkane sulfonic acids (PFSAAs) and their potential precursors. *Environ. Int.* 60 (0): 242-248. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2013.08.021>
- Zhang, C., H. Yan, F. Li, X. Hu and Q. Zhou (2013). Sorption of short- and long-chain perfluoroalkyl surfactants on sewage sludges. *J. Hazard. Mater.* 260: 689-699. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.06.022>

Korrespondenzadresse:

Hanna Ulrich
 Bayerisches Landesamt für Umwelt
 Referat für Stoff- und Chemikalienbewertung
 Demollstraße 31
 82407 Wielenbach
 Tel: 0881-185151
 Fax: 0881-41318



Effektive Reduktion der antibakteriellen Aktivität des Fluorchinolons Danofloxacin durch die Biotransformation mit dem Ascomyceten *Xylaria longipes*

Marina Rusch¹ (marina.rusch@lcb.chemie.uni-giessen.de), Annika Kauschat¹ (annikauschat@gmail.com), Astrid Spielmeyer¹ (astrid.spielmeyer@lcb.chemie.uni-giessen.de), Andreas Römpf² (andreas.roempf@anorg.Chemie.uni-giessen.de), Heike Hausmann³ (heike.hausmann@org.chemie.uni-giessen.de), Holger Zorn¹ (holger.zorn@uni-giessen.de) und Gerd Hamscher¹ (gerd.hamscher@uni-giessen.de)

¹ Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Heinrich-Buff-Ring 17, 35392 Gießen

² Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Heinrich-Buff-Ring 17, 35392 Gießen

³ Institut für Organische Chemie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Heinrich-Buff-Ring 17, 35392 Gießen

Abstract: Antibiotika werden in großen Mengen in der Nutztierhaltung eingesetzt. Aufgrund ihrer häufig geringen Metabolisierung und durch Düngung der Böden mit Gülle können sie in die Umwelt gelangen und damit die Resistenzbildung fördern. In dieser Studie wurde gezeigt, dass Danofloxacin, ein Fluorchinolon, durch den Ascomyceten *X. longipes* schnell, regioselektiv und nahezu quantitativ zu Danofloxacin-N-oxid umgesetzt wird. Die Identität des Biotransformationsproduktes wurde mittels hochauflösender Massenspektrometrie sowie ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie aufgeklärt. Im Vergleich zur Muttersubstanz weist Danofloxacin-N-oxid eine um 80% reduzierte antibakterielle (Rest-)Aktivität auf. Die Biotransformation von Fluorchinolonen durch Pilze kann so zur Minimierung der Wirkung von Antibiotika in der Umwelt beitragen.

Einleitung

Antibiotika können das Wachstum von Bakterien hemmen oder diese abtöten. Insofern haben antibakterielle Wirkstoffe nach wie vor einen hohen therapeutischen Wert sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin. In der Nutztierhaltung werden – trotz rückläufiger Tendenz – Antibiotika in großen Mengen eingesetzt. Laut Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) wurden im Jahr 2014 1.238 Tonnen Antibiotika von pharmazeutischen Unternehmen an Tierärzte in Deutschland abgegeben. Dies entspricht 214 Tonnen (~15%) weniger als im Vorjahr und ca. 468 Tonnen (~27%) weniger als im Jahr 2011, in dem die Abgabe erstmals erfasst wurde [1]. Obwohl die abgegebene Menge an älteren Wirkstoffen, von denen Penicilline (450 t), Tetracycline (342 t) und Sulfonamide (121 t) den Großteil ausmachen, erneut gesunken ist, ist im gleichen Zeitraum der Anteil an hochwirksamen Fluorchinolonen um rund 50% (2011: 8 t, 2013/14: 12 t) gestiegen. Dies ist insofern bedenklich, da Fluorchinolone zu den Reserveantibiotika in der Humanmedizin gehören und aufgrund ihrer noch guten Wirksamkeit von der WHO als „Critically Important Antimicrobials“ eingestuft sind [2].

Fluorchinolone (FC) stellen eine wichtige Gruppe von synthetischen Antibiotika mit einem breiten antimikrobiellen Wirkungsspektrum gegen gram-positive und gram-negative Bakterien

dar [3]. Das in dieser Arbeit untersuchte Danofloxacin (DFX, Abbildung 1) wird ausschließlich in der Veterinärmedizin eingesetzt.

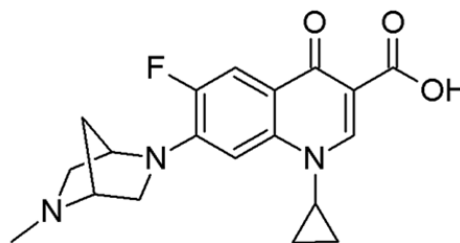


Abb. 1: Strukturformel von Danofloxacin

FC wirken bakterizid, indem sie das bakterielle Enzym Gyrase hemmen, das zu den Topoisomerasen gehört und u.a. für die Entspiralisierung der DNA im Rahmen der Zellteilung verantwortlich ist [4].

Im Gegensatz zu anderen Wirkstoffklassen, wie den Penicillinen, sind FC sehr stabil und gegen Hydrolyse sowie höhere Temperaturen unempfindlich. FC werden hauptsächlich unverändert oder nur teilweise metabolisiert ausgeschieden. Die Metabolisierung von Enrofloxacin, des wichtigsten Fluorchinolons in der Tiermedizin, führt durch Deethylierung zu Ciprofloxacin, dem potentesten Vertreter dieser Gruppe mit ausschließlich humanmedizinischer Verwendung. Geringe Mengen von N-Desalkyl- und N-oxid-Metaboliten wurden ebenfalls als Transformationsprodukte von Enrofloxacin beschrieben [5,6].

Aufgrund der schwachen Metabolisierung und ihrer Persistenz können antibiotisch wirksame Substanzen in unterschiedliche Umweltkompartimente gelangen [7,8]. Nach Einsatz in der Humanmedizin lassen sich die Wirkstoffe v.a. in Kommunal- und Hospitalabwässern wiederfinden, während die Verwendung von Antibiotika in der Tiermedizin zum Eintrag beträchtlicher Mengen in Gülle [9] und in Stallstäube [10] führen kann. Nach Gülledüngung landwirtschaftlicher Felder können die Wirkstoffe in den Boden [9,11], in Nutzpflanzen [7,12] sowie in Oberflächengewässer [13] und im Falle der Sulfonamide

auch in das Grundwasser [11] gelangen. Eine unsachgemäße Verwendung von Antibiotika und das Vorkommen subtherapeutischer Wirkstoffmengen in der Umwelt begünstigt die Vermehrung (multi-)resistenter Bakterien. Diese lassen sich mit dem vorhandenen Wirkstoffarsenal nur noch schwer bekämpfen. Ein Wirksamkeitsverlust von Reserveantibiotika kann für Mensch und Tier lebensbedrohlich sein. Aus diesem Grund ist es sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin zwingend geboten, Antibiotika nur nach strenger Indikation einzusetzen sowie die Einträge antibiotisch wirksamer Substanzen in die Umwelt zu reduzieren.

Die zunehmende Resistenzentwicklung wurde mittlerweile als ein weltweites Problem erkannt. Die Unterstützung von Maßnahmen zu deren Bekämpfung durch die WHO war ein Schwerpunktthema beim G7-Gipfel 2015 [14].

Die Behandlung antibiotikabelasteter Gülle mit Mikroorganismen könnte eine Möglichkeit zur Reduzierung der Antibiotikaeinträge in die Umwelt darstellen. Die Fähigkeit von Mikroorganismen, FC abzubauen, ist wiederholt beschrieben worden [15-17]. Insbesondere Pilze sind durch ihre hoch komplexe Ausstattung an Enzymen in der Lage, auch chemisch stabile Substanzen zu metabolisieren. Während ihres Abbaus durch Asco- und Basidiomyceten wurden u. a. Hydroxylierungen, Decarboxylierungen, die Addition von Formyl- oder Acetylgruppen, die Defluorierung, der Austausch des Piperazin-Substituenten durch eine Aminogruppe sowie die Bildung von Konjugaten als Abbaureaktionen beschrieben [18-20]. Auch die Mineralisierung von FC wurde beobachtet [19].

Das Ziel dieser Arbeit war deshalb, die Biotransformation von Danofloxacin durch den Ascomyceten *X. longipes* detailliert zu untersuchen. Neben der Isolierung und Identifizierung der gebildeten Biotransformationsprodukte sollte auch die antibakterielle (Rest-)Aktivität bestimmt werden.

Material und Methoden

Ausführliche Informationen zu Material und Methoden sind in [21] zu finden.

X. longipes wurde in einem Flüssigmedium in Anwesenheit von DFX (20 mg L⁻¹) 10 Tage bei 24 °C und unter Lichtausschluss kultiviert. Biotische (Pilzkultur ohne DFX) und abiotische (Kulturmedium mit DFX) Kontrollen wurden mitgeführt. Regelmäßig entnommene Proben wurden mittels HPLC-DAD analysiert. Für die Metabolitproduktion wurde das Experiment in einem größeren Maßstab wiederholt. Nach präparativer chromatographischer Isolierung wurde die Struktur des Metaboliten mittels hochauflösender Massenspektrometrie (HRMS), MS²- und MS³-Experimenten sowie ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie aufgeklärt und verifiziert. Die antimikrobielle (Rest-)Aktivität des isolierten Biotransformationsproduktes wurde mittels eines Brillantschwarz-Reduktionstests bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

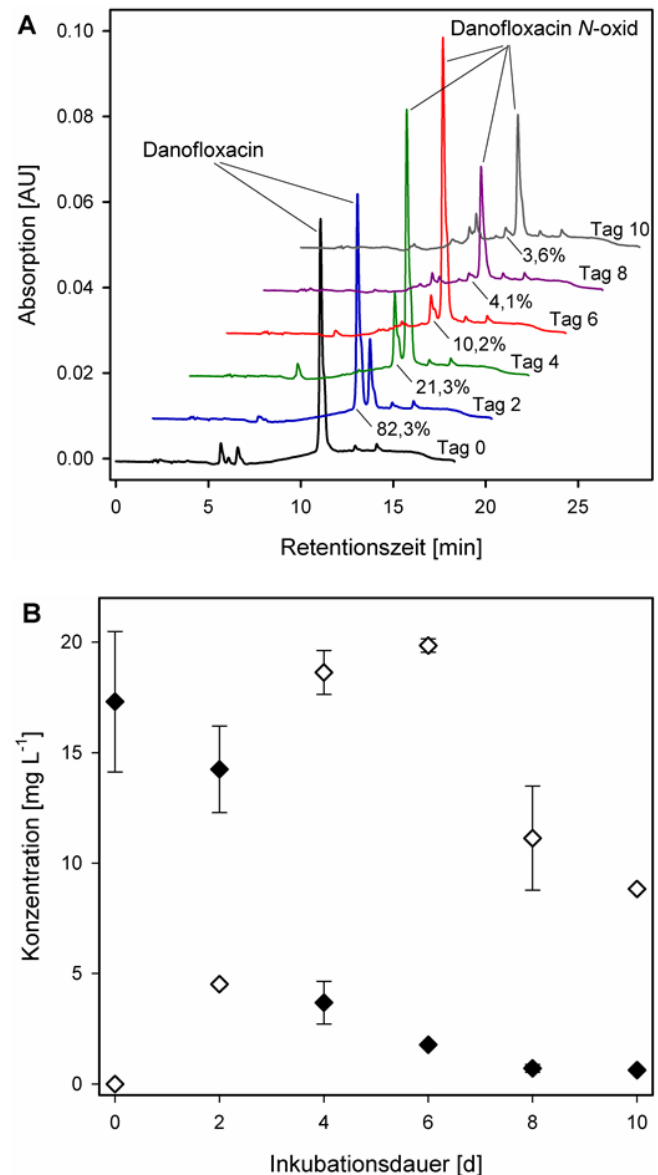


Abb. 2: Abbau von Danofloxacin und Bildung des Metaboliten Danofloxacin-N-oxid durch *X. longipes*. (A) HPLC-DAD-Chromatogramme (284 nm) und (B) während des Kulturverlaufs detektierte Konzentrationen an Danofloxacin (schwarz) und Danofloxacin-N-oxid (weiß) (Doppelbestimmung ± Spannweite) (modifiziert nach [21]).

In Kulturen des Ascomyceten *X. longipes* nahm die mittlere Konzentration von DFX im Verlauf einer Inkubation von 10 Tagen von anfänglich 17,3 mg auf 0,6 mg L⁻¹ ab. Parallel zur abnehmenden DFX-Konzentration wurde eine neue Verbindung detektiert, die weder in den biotischen noch in den abiotischen Kontrollen auftrat (Abbildung 2A). Der Metabolit eluierte 0,6 min später als DFX und wies ein sehr ähnliches Absorptionsspektrum ($\lambda_{\max} = 280$ nm) auf. Die Abnahme der DFX-Konzentration ging mit einem Anstieg der Metabolitkonzentration mit einem Maximum an Tag 6 von 19,8 mg L⁻¹ einher (Abbildung 2B).

Tabelle 1. Massenspektrometrische Daten von Danofloxacin (DFX) und Danofloxacin-N-oxid (DFX-O) (modifiziert nach [21]).

	[M+H] ⁺ [m/z]	[M+H] ⁺ [m/z]	Summenformel [M+H] ⁺	Massen-abweichung	
	(exp.)	(theor.)		[mDa]	[ppm]
DFX	358,15641	358,156146	C ₁₉ H ₂₁ FN ₃ O ₃ ⁺	0,264	0,737
	340,14596	340,145581	C ₁₉ H ₁₉ FN ₃ O ₂ ⁺	0,379	1,114
	338,15022	338,149918	C ₁₉ H ₂₀ N ₃ O ₃ ⁺	0,302	0,893
	320,13969	320,139353	C ₁₉ H ₁₈ N ₃ O ₂ ⁺	0,337	1,053
	314,16660	314,166317	C ₁₈ H ₂₁ FN ₃ O ⁺	0,283	0,901
DFX-Fragmente (MS²)	294,16035	294,160089	C ₁₈ H ₂₀ N ₃ O ⁺	0,261	0,887
	283,12437	283,124118	C ₁₇ H ₁₆ FN ₂ O ⁺	0,252	0,890
	271,12434	271,124118	C ₁₆ H ₁₆ FN ₂ O ⁺	0,222	0,819
	255,05665	255,056432	C ₁₄ H ₈ FN ₂ O ₂ ⁺	0,218	0,855
	231,09305	231,092818	C ₁₃ H ₁₂ FN ₂ O ⁺	0,232	1,004
DFX-O	374,15139	374,151061	C ₁₉ H ₂₁ FN ₃ O ₄ ⁺	0,329	0,879
	356,14062	356,140496	C ₁₉ H ₁₉ FN ₃ O ₃ ⁺	0,124	0,348
	336,13436	336,134268	C ₁₉ H ₁₈ N ₃ O ₃ ⁺	0,092	0,274
	330,16132	330,161232	C ₁₈ H ₂₁ FN ₃ O ₂ ⁺	0,088	0,267
DFX-O-Fragmente (MS²)	327,11404	327,113947	C ₁₈ H ₁₆ FN ₂ O ₃ ⁺	0,093	0,284
	283,12416	283,124118	C ₁₇ H ₁₆ FN ₂ O ⁺	0,042	0,148
	271,12411	271,124118	C ₁₆ H ₁₆ FN ₂ O ⁺	-0,008	-0,030
	255,05650	255,056432	C ₁₄ H ₈ FN ₂ O ₂ ⁺	0,068	0,267
	231,09295	231,092818	C ₁₃ H ₁₂ FN ₂ O ⁺	0,132	0,571

Die HRMS-Analyse des isolierten Biotransformationsproduktes zeigte ein Molekül-Ion mit einer exakten Masse von [M+H]⁺ = 374,15139. Eine Massendifferenz von 15,99498 zur Muttersubstanz DFX ([M+H]⁺ = 358,15641) wies auf die Addition eines Sauerstoffatoms (theoretische Masse von Sauerstoff: 15,99492 Da) hin (Tabelle 1). Beide Verbindungen zeigten gleiche Fragment-Ionen mit m/z 283, 271, 255 und 231. ESI⁺-MS³-Fragmentierungsexperimente des Vorläufer-Ions mit m/z 327, das nur im MS²-Spektrum des Metaboliten und nicht des DFX detektiert wurde, zeigten ein intensives Fragment-Ion mit m/z 283, welches hingegen in MS²-Spektren beider Verbindungen zu finden war und auf ein intaktes Fluorchinolon-Grundgerüst hindeutete. Die Anwesenheit des Fragment-Ions mit m/z 327 im MS²-Spektrum des Metaboliten wies somit auf die Addition eines Sauerstoffatoms am methylierten Stickstoffatom des Piperazin-Substituenten von DFX hin. Für die endgültige Strukturaufklärung wurden ein- und zweidimensionale NMR-Experimente (¹H, ¹³C NMR, DEPT-135, ¹H, ¹H-COSY, ¹H, ¹³C-HSQC und ¹H, ¹³C-HMBC) durchgeführt (ausführliche Ergebnisse siehe [21]). Die NMR-Ergebnisse bestätigten die massenspektrometrischen Daten. Der Metabolit wurde als Danofloxacin-N-oxid (DFX-O) mit einem Sauerstoffatom am terminalen Stickstoff des Piperazin-Substituenten identifiziert (Abbildung 3).

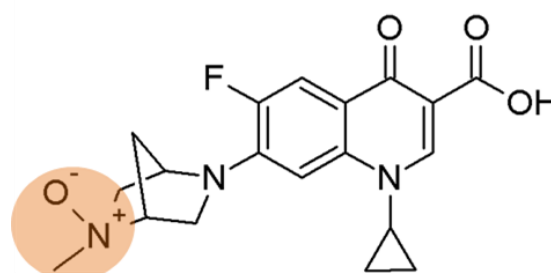


Abb. 3: Strukturformel von Danofloxacin-N-oxid (modifiziert nach [21])

Die antibakterielle (Rest-)Aktivität des isolierten Biotransformationsproduktes DFX-O wurde in Relation zur Muttersubstanz DFX mittels eines modifizierten Brillantschwarz-Reduktionstests bestimmt. Beide Substanzen führten zu einer nahezu 100%igen Hemmung ab einer Konzentration von 30 mg L⁻¹, während unter 2 mg L⁻¹ keine Hemmung hervorgerufen wurde. Dabei zeigte sich im direkten Vergleich von Metabolit und Muttersubstanz, dass DFX bereits in einer Konzentration von 4 mg L⁻¹ und DFX-O erst in einer Konzentration von 20 mg L⁻¹ zu einer Hemmung von 60% führen. Hieraus leitet sich eine 20%ige antibakterielle (Rest-)Aktivität von DFX-O ab (Abbildung 4).

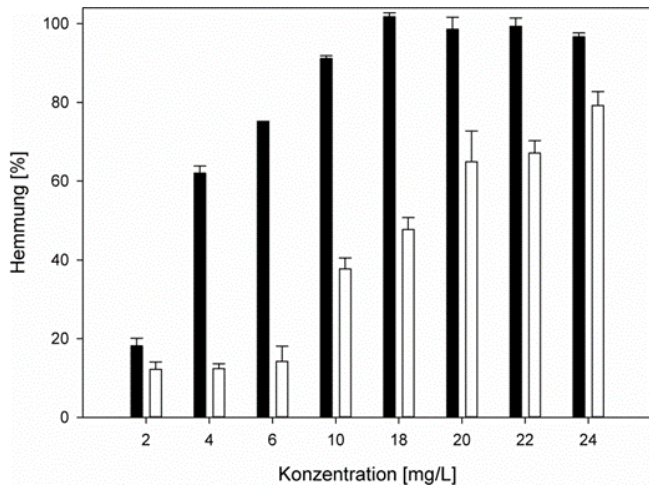


Abb. 4: Antibakterielle Aktivität von Danofloxacin (schwarz) und Danofloxacin-N-oxid (weiß) in einem Brillantschwarz-Reduktionstest (Dreifachbestimmung \pm Standardabweichung) (modifiziert nach [21]).

Innerhalb der Fluorchinolone wurde die Bildung von Enrofloxacin-N-Oxid durch *U. ramanniana*, *G. striatum* und anderen Pilzen beschrieben [19]. Chen und Mitarbeiter beschrieben die Umsetzung von DFX zu den entsprechenden N-Desmethyl- und N-Oxid-Metaboliten durch den Pilz *R. arrhizus*, wobei die Bildung von DFX-O lediglich durch Detektion der erwarteten Masse ($[M+H]^+ m/z$ 374) in den Pilzkulturen vermutet wurde [16]. Dass eine Oxidation des Stickstoffatoms am substituierten Piperazinring zu einer deutlichen Reduktion der antibakteriellen (Rest-)Aktivität im Vergleich zur Muttersubstanz führt, wurde bereits anhand anderer Fluorchinolone beschrieben [22, 23].

In mikrobiellen Biotransformationsprozessen von Antibiotika ist es wichtig, nicht nur die Struktur der Transformationsprodukte zu untersuchen, sondern auch ihre antibakterielle (Rest-)Aktivität zu bestimmen. Auch wenn die Reduktion der antibakteriellen Aktivität erwünscht ist, sollte ein besonderes Augenmerk auf die Biotransformationsprodukte gelegt werden, die – wie im Falle von Tetracyclin – die Resistenzentwicklung fördern könnten [24].

Unsere aktuellen Untersuchungen und Literaturdaten zeigen, dass Pilze Antibiotika effizient und hochselektiv zu Metaboliten mit keiner oder geringerer antibakteriellen (Rest) Aktivität umsetzen und somit eine wichtige ökologische Rolle in der Umwelt spielen können.

Literatur

- [1] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Antibiotikaabgabe in der Tiermedizin sinkt weiter. URL (https://www.bvl.bund.de/DE/08_PresseInfothek/01_FuerJournalisten/01_Presse_und_Hintergrundinformationen/05_Tierarzneimittel/2015_07_28_pi_Antibiotikaabgabemenge2014.html). (Mai 2016).
- [2] World Health Organization. Critically important antimicrobials for human medicine. URL (<http://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-third/en/>). (Mai 2016).
- [3] McGuirk, P. R.; Jefson, M. R.; Mann, D. D.; Elliott, N. C.; Chang, P.; Cisek, E. P.; Cornell, C. P.; Gootz, T. D.; Haskell, S. L.; Hindahl, M. S.; LaFleur, L. J.; Rosenfeld, M. J.; Shryock, T. R.; Silvia, A. M.; Weber, F. H. Synthesis and structure-activity relationships of 7-

- diazabicycloalkylquinolones, including danofloxacin, a new quinolone antibacterial agent for veterinary medicine. *J. Med. Chem.* 1992, 35, 611–620.
- [4] Hooper, D. C. Mode of action of fluoroquinolones. *Drugs* 1999, 58, 6–10.
- [5] Slana, M.; Pahor, V.; Maričić, L. C.; Sollner-Dolenc, M. Excretion pattern of enrofloxacin after oral treatment of chicken broilers. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 2014, 37, 611–614.
- [6] Lykkeberg, A. K.; Halling-Sørensen, B.; Jensen, L. B. Susceptibility of bacteria isolated from pigs to tiamulin and enrofloxacin metabolites. *Vet. Mic.* 2007, 121, 116–124.
- [7] Boxall, A. B. A.; Johnson, P.; Smith, E. J.; Sinclair, C. J.; Stutt, E.; Levy, L. S. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 2288–2297.
- [8] Golet, E. M.; Alder, A. C.; Giger, W. Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Environ. Sci. Technol.* 2002, 36, 3645–3651.
- [9] Sattlerberger, R.; Gans, O.; Martinez, E. Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden. Umweltbundesamt 2005, Wien.
- [10] Hamscher, G.; Pawelzick, H. T.; Sczesny, S.; Nau, H.; Hartung, J. Antibiotics in dust originating from a pig-fattening farm: A new source of health hazard for farmers? *Environ. Health Perspect.* 2003, 111, 1590–1594.
- [11] Hamscher, G.; Mohring, S. A. I. Veterinary drugs in soil and in the aquatic environment. *Chem. Ing. Tech.* 2012, 84, 1052–1061.
- [12] Grote, M.; Schwake-Anduschus, C.; Michel, R.; Stevens, H.; Heyser, W.; Langenkämper, G.; Betsche, T.; Freitag, M. Incorporation of veterinary antibiotics into crops from manured soil. *Landbauforsch. Voelkenrode* 2007, 57, 25–32.
- [13] Pena, A.; Chmielova, D.; Lino, C. M.; Solich, P. Determination of fluoroquinolone antibiotics in surface waters from Mondego River by high performance liquid chromatography using a monolithic column. *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 2924–2928.
- [14] Presse- und Informationsamt der Bundesregierung. Abschlusserklärung G7-Gipfel. (https://www.g7germany.de/Content/DE/Anlagen/G8_G20/2015-06-08-g7-abschluss-deu.pdf?blob=publicationFile&v=5). (Mai 2016).
- [15] Amorim, C. L.; Moreira, I. S.; Maia, A. S.; Tiritan, M. E.; Castro, P. M. L. Biodegradation of ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin as single and mixed substrates by *Labrys portucalensis* F11. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 98, 3181–3190.
- [16] Chen, Y.; Rosazza, J. P. N.; Reese, C. P.; Chang, H. Y.; Nowakowski, M. A.; Kiplinger, J. P. Microbial models of soil metabolism: biotransformations of danofloxacin. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1997, 19, 378–384.
- [17] Liu, Z.; Sun, P.; Pavlostathis, S. G.; Zhou, X.; Zhang, Y. Adsorption, inhibition, and biotransformation of ciprofloxacin under aerobic conditions. *Biores. Technol.* 2013, 144, 644–651.
- [18] Čvančarová, M.; Moeder, M.; Filipová, A.; Reemtsma, T.; Cajthaml, T. Biotransformation of the antibiotic agent flumequine by ligninolytic fungi and residual antibacterial activity of the transformation mixtures. *Environ. Sci. Technol.* 2013, 47, 14128–14136.
- [19] Parshikov, I. A.; Sutherland, J. B. Microbial transformations of antimicrobial quinolones and related drugs. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 39, 1731–1740.
- [20] Prieto, A.; Möder, M.; Rodil, R.; Adrian, L.; Marco-Urrea, E. Degradation of the antibiotics norfloxacin and ciprofloxacin by a white-rot fungus and identification of degradation products. *Biores. Technol.* 2011, 102, 10987–10995.
- [21] Rusch, M.; Kauschat, A.; Spielmeier, A.; Römpf, A.; Hausmann, H.; Zorn, H.; Hamscher, G. Biotransformation of the antibiotic danofloxacin by *Xylaria longipes* leads to an efficient reduction of its antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63, 6897–6904.
- [22] White, L. O.; MacGowan, A. P.; Lovering, A. M.; Reeves, D. S.; Mackay, I. G. A preliminary report on the pharmacokinetics of ofloxacin, desmethyl ofloxacin and ofloxacin N-oxide in patients with chronic renal failure. *Drugs* 1987, 34, 56–61.
- [23] Venezia, R. A.; Prymas, L. A.; Shayegani, A.; Yocum, D. M. In vitro activities of amifloxacin and two of its metabolites. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989, 33, 762–766.
- [24] Palmer, A. C.; Angelino, E.; Kishony, R. Chemical decay of an antibiotic inverts selection for resistance. *Nat. Chem. Biol.* 2010, 6, 105–107.