



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

Marina Rusch<sup>1</sup> ([marina.rusch@lcb.chemie.uni-giessen.de](mailto:marina.rusch@lcb.chemie.uni-giessen.de)), Annika Kauschat<sup>1</sup> ([annikauschat@gmail.com](mailto:annikauschat@gmail.com)), Astrid Spielmeyer<sup>1</sup> ([astrid.spielmeyer@lcb.chemie.uni-giessen.de](mailto:astrid.spielmeyer@lcb.chemie.uni-giessen.de)), Andreas Römpf<sup>2</sup> ([andreas.roempf@anorg.Chemie.uni-giessen.de](mailto:andreas.roempf@anorg.Chemie.uni-giessen.de)), Heike Hausmann<sup>3</sup> ([heike.hausmann@org.chemie.uni-giessen.de](mailto:heike.hausmann@org.chemie.uni-giessen.de)), Holger Zorn<sup>1</sup> ([holger.zorn@uni-giessen.de](mailto:holger.zorn@uni-giessen.de)) und Gerd Hamscher<sup>1</sup> ([gerd.hamscher@uni-giessen.de](mailto:gerd.hamscher@uni-giessen.de))

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

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

<sup>3</sup> 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.

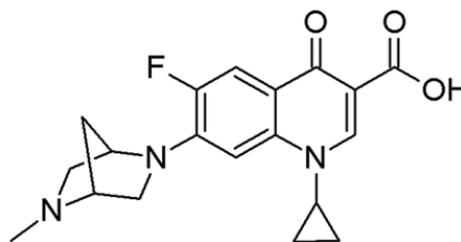


Abb. 1: Strukturformel von Danofloxacin

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].

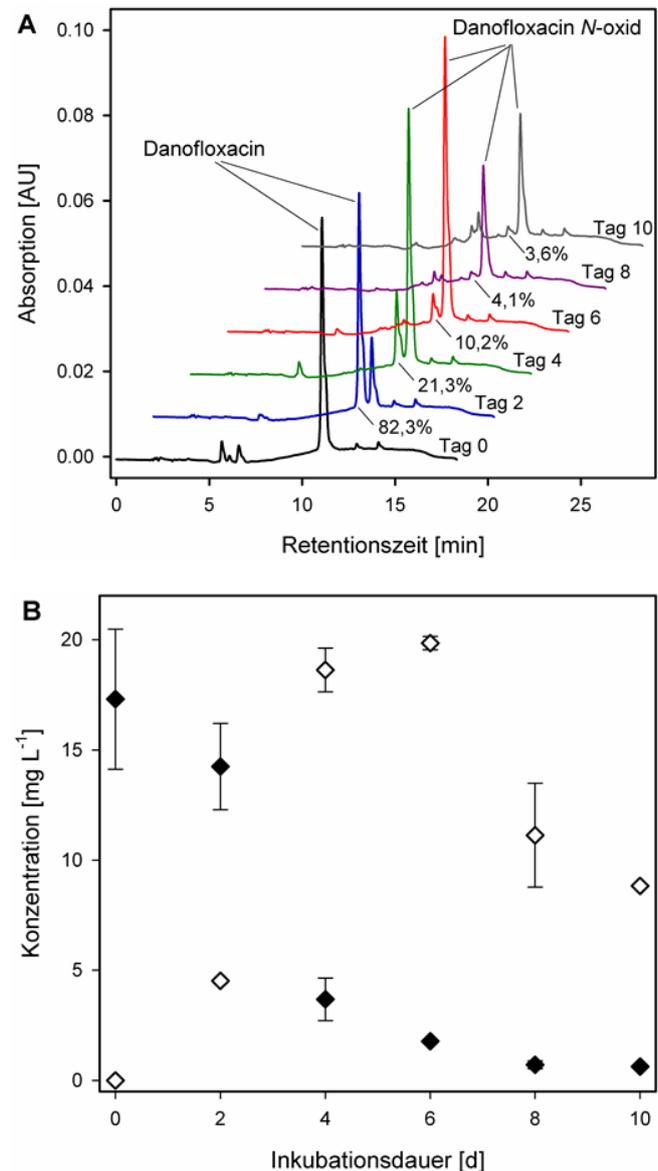
Das Ziel dieser Arbeit war deshalb, die Biotransformation von Danofloxacin durch den Ascomyceten *X. longipes* detailliert zu untersuchen. Neben der Isolierung und Identifizierung der gebildeten Biotransformationsprodukte sollte auch die antibakterielle (Rest-)Aktivität bestimmt werden.

### 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<sup>-1</sup>) 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), MS<sup>2</sup>- und MS<sup>3</sup>-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



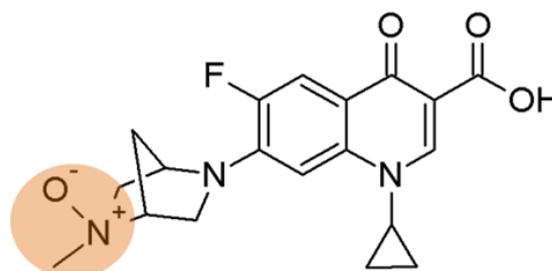
**Abb. 2:** Abbau von Danofloxacin und Bildung des Metaboliten Danofloxacin-N-oxid durch *X. longipes*. (A) HPLC-DAD-Chromatogramme (284 nm) und (B) während des Kulturverlaufs detektierte Konzentrationen an Danofloxacin (schwarz) und Danofloxacin-N-oxid (weiß) (Doppelbestimmung  $\pm$  Spannweite) (modifiziert 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> einher (Abbildung 2B).

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

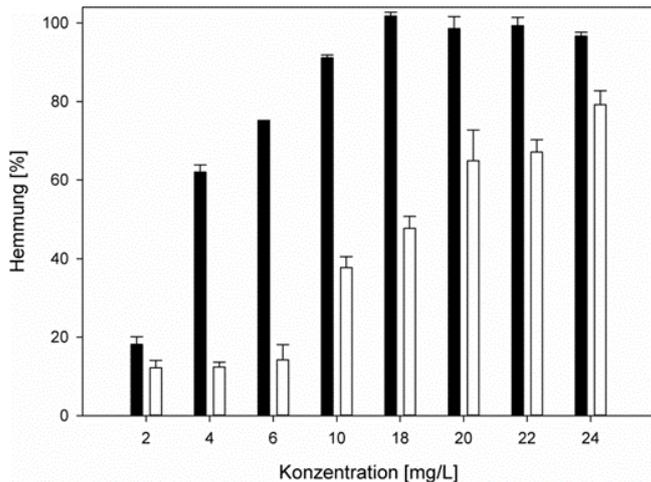
	[M+H] <sup>+</sup> [m/z]	[M+H] <sup>+</sup> [m/z]	Summenformel	Massen-abweichung	
	(exp.)	(theor.)		[M+H] <sup>+</sup>	[mDa]
<b>DFX</b>	358,15641	358,156146	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	0,264	0,737
	340,14596	340,145581	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> FN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

Die HRMS-Analyse des isolierten Biotransformationsproduktes zeigte ein Molekül-Ion mit einer exakten Masse von [M+H]<sup>+</sup> = 374,15139. Eine Massendifferenz von 15,99498 zur Muttersubstanz DFX ([M+H]<sup>+</sup> = 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<sup>+</sup>-MS<sup>3</sup>-Fragmentierungsexperimente des Vorläufer-Ions mit m/z 327, das nur im MS<sup>2</sup>-Spektrum des Metaboliten und nicht des DFX detektiert wurde, zeigten ein intensives Fragment-Ion mit m/z 283, welches hingegen in MS<sup>2</sup>-Spektralen beider Verbindungen zu finden war und auf ein intaktes Fluorchinolon-Grundgerüst hindeutete. Die Anwesenheit des Fragment-Ions mit m/z 327 im MS<sup>2</sup>-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 (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR, DEPT-135, <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-HSQC und <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-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<sup>-1</sup>, während unter 2 mg L<sup>-1</sup> keine Hemmung hervorgerufen wurde. Dabei zeigte sich im direkten Vergleich von Metabolit und Muttersubstanz, dass DFX bereits in einer Konzentration von 4 mg L<sup>-1</sup> und DFX-O erst in einer Konzentration von 20 mg L<sup>-1</sup> 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](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](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.