



Bestimmung des ökotoxikologischen Potentials von Antibiotika mittels minimaler Hemmkonzentration (MHK) und QSAR-Analyse

Melanie Voigt (melanie.voigt@hs-niederrhein.de), Benjamin Hentschel (benjovi@ish.de),
Indra Bartels (indra.bartels@stud.uni-due.de), Anna Nickisch-Hartfiel (Anna.Nickisch@hs-niederrhein.de)
und Martin Jäger (martin.jaeger@hs-niederrhein.de)

Abstract

Antibiotika werden weltweit in verschiedenen Gewässern gefunden, so dass in den letzten Jahren die Erforschung verschiedener Verfahren zur Beseitigung dieser Mikroschadstoffe intensiviert wurde. Im Fokus steht unter anderem die Verwendung von UV-Strahlung, die zu den Advanced Oxidation Processes gehört. Durch Anwendung dieser Verfahren können auch Produkte entstehen, die noch ökotoxi-

kologisch gefährlicher als ihre Ausgangssubstanz sind. Um die Giftigkeit dieser Substanzen abschätzen zu können gibt es Methoden, die in diesem Artikel näher betrachtet werden. Als Beispiel für diese Analysen werden das Fluorchinolon Ciprofloxacin und dessen photoinduzierte Abbau- bzw. Transformationsprodukte ausgewählt, die weltweit eine Gefahr für die aquatische Umwelt darstellen können.

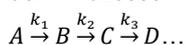
Einleitung

Weltweit werden eine große Anzahl anthropogener Mikroschadstoffe, wie zum Beispiel Pharmazeutika, Pflanzenschutzmittel oder Körperpflegeprodukte, in verschiedenen Gewässern nachgewiesen (Balakrishna *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017; Voigt und Jaeger, 2021). Haupteintragswege sind Kläranlagen, die mit den herkömmlichen drei Reinigungsstufen, der mechanischen, biologischen und chemischen, ausgestattet sind. Diese Verfahren reichen nicht aus, um Mikroschadstoffe vollständig aus dem Abwasser zu eliminieren. Somit gelangen diese Mikroschadstoffe ungehindert in die aquatische Umwelt und stellen eine potentielle Gefahr für die dort befindlichen Pflanzen und Tiere dar. Mittels hochauflösender Massenspektrometrie, wie Q-TOF-MS oder Orbitrap-

MS, konnten Konzentrationen ohne vorherige Aufarbeitung der Probe bis in den Nanogrammbereich in Wässern nachgewiesen werden. Die EU hat deswegen neben der Wasserrahmenrichtlinie auch eine Watchlist eingeführt, auf der besonders Substanzen stehen, für die unzureichende Analyse- daten vorhanden sind. Auch das Antibiotikum Ciprofloxacin steht im Fokus der zweiten EU Watchlist (Decision 2018/840, 2018). Ciprofloxacin wird in Konzentrationen von ca. 15 bis 325 ng·L⁻¹ in Oberflächengewässern und Grundwasser gefunden. Auch im Trinkwasser konnte dieses Antibiotikum mit Konzentrationen zwischen 10 und 35 ng·L⁻¹ nachgewiesen werden (Voigt *et al.*, 2020).

Beseitigung von Mikroschadstoffen mittels Advanced Oxidation Processes

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Verfahren zur Beseitigung von Mikroschadstoffen erforscht. Es existieren biologische, physikalische und chemische erweiterte Reinigungsverfahren (Voigt *et al.*, 2020). Zu den chemischen Reinigungsverfahren zählen sogenannte Advanced Oxidation Processes. Bei diesen Prozessen werden z. B. OH-Radikale generiert, die als starke Oxidationsmittel die Mikroschadstoffe zerstören. Zu den Prozessen zählen zum Beispiel die Ozonung, die UV



Die Konzentration c des Eduktes A nimmt in Abhängigkeit von

$$c_A = c_{A_0} \cdot e^{-k_1 t}$$

Auch die Abbau- bzw. Transformationsprodukte können kinetisch als Folge- bzw. Folge-Folge-Reaktion erster Ordnung

$$c_B = c_{A_0} \cdot \frac{k_1}{k_2 - k_1} \cdot (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t})$$

$$c_C = (c_{A_0} \cdot k_1 \cdot k_2) \cdot \left(\frac{e^{-k_1 t}}{(k_2 - k_1)(k_3 - k_1)} - \frac{e^{-k_2 t}}{(k_2 - k_1)(k_3 - k_2)} + \frac{e^{-k_3 t}}{(k_3 - k_1)(k_3 - k_2)} \right)$$

In Abbildung 1 sind die MS-Peak-Area gegen Bestrahlungszeit als Repräsentationen der Konzentrations-Zeitkurven von Ciprofloxacin und seiner vier am häufigsten entstandenen Abbau- bzw. Transformationsprodukte dargestellt. Der Abbau

Bestrahlung mit verschiedenen Photokatalysatoren und die Sonolyse (Voigt *et al.*, 2020).

All diese Verfahren können nach Reaktion 1. oder pseudo-1. Ordnung beschrieben werden. Dabei entstehen aus einer Substanz A verschiedene Abbau- oder Transformationsprodukte (B , C , ...), siehe Gleichung 1. Dieser Ansatz beschreibt nur die sukzessive Bildung von Transformationsprodukten, nicht ihr paralleles Entstehen.

Gl. 1

der Zeit t mit der Geschwindigkeitskonstante k_1 wie in Gleichung 2 beschrieben, ab.

Gl. 2

mit den Geschwindigkeitskonstanten k_1 , k_2 und k_3 beschrieben werden, siehe Gleichungen 3 und 4 (Mauser, 1974).

Gl. 3

Gl. 4

erfolgte mit Hilfe einer Niederdruck UVC-Lampe mit einem Photonenfluss von 2.03 mmol·min⁻¹·L⁻¹ und emittierten Strahlungswellenlängen von 185, 254, 313, 365, 405, 437, 547, 578, und 580 nm.

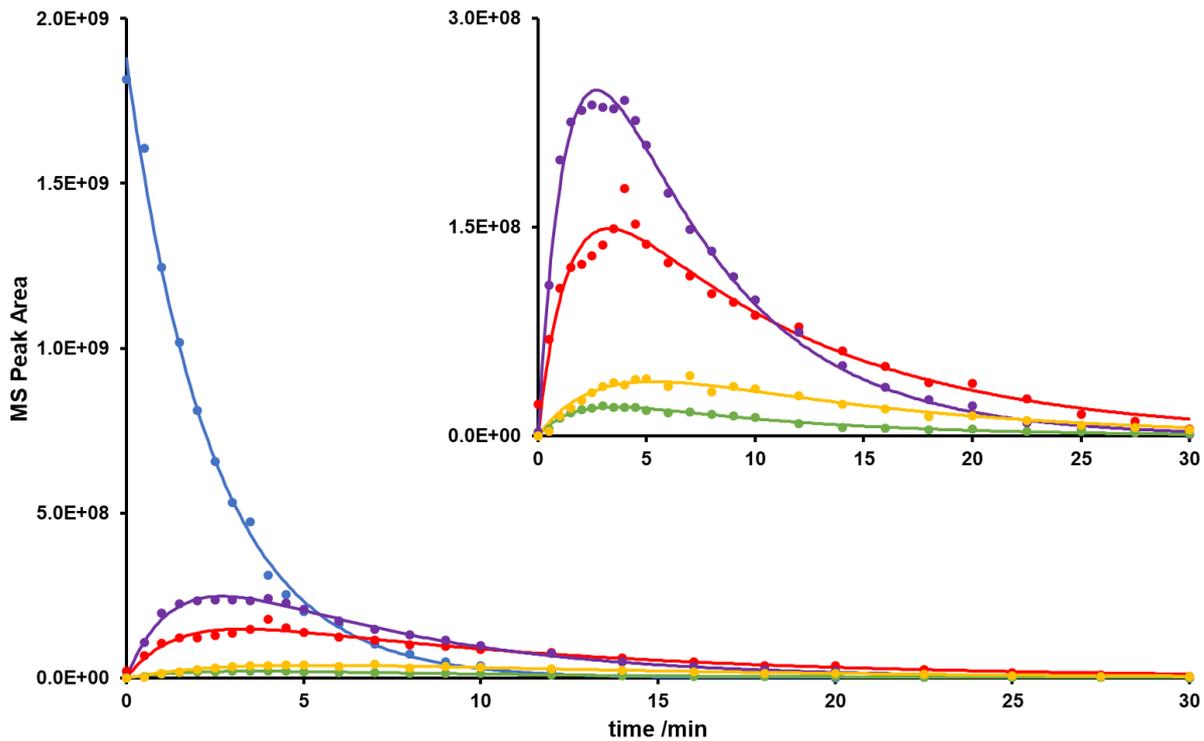


Abbildung 1: Konzentrations (MS-Peak-Area)-Zeit-Kurven von Ciprofloxacin (blau), Cip330 (lila), Cip288 (rot), Cip348 (gelb), Cip304 (grün); aufgenommen mittels HPLC-ESI-Q-TOF-MS (Agilent 1200er Series und Agilent 6530)

Ciprofloxacin war nach 15 min UVC-Bestrahlung nicht mehr nachweisbar; allerdings waren zu diesem Zeitpunkt noch die Abbau- bzw. Transformationsprodukte erkennbar. Hier musste

die UVC-Bestrahlung mindestens 30 min erfolgen, um auch diese Folgeprodukte zu eliminieren. Die dazu ermittelten Geschwindigkeitskonstanten sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Geschwindigkeitskonstanten der photoinduzierten Degradation von Ciprofloxacin und die entstandenen Abbau- bzw. Transformationsprodukte

Substanz	k_1 / min^{-1}	k_2 / min^{-1}
Ciprofloxacin	0.42	
Cip288	0.10	0.69
Cip304	0.11	0.57
Cip330	0.17	0.69
Cip348	0.09	0.34

Alle entstandenen Produkte konnten als Folgeprodukte beschrieben werden. Die zu den Konzentrations-Zeit Kurven

beschriebenen Produkte sind mit ihren vorgeschlagenen Strukturformeln in Abbildung 2 dargestellt.

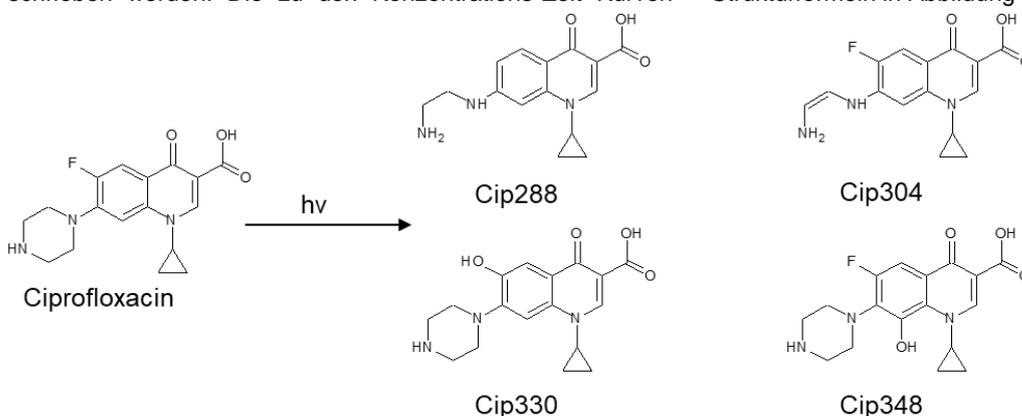


Abbildung 2: Vorgeschlagene Abbau- bzw. Transformationsprodukte des photoinduzierten Abbaus von Ciprofloxacin

Durch diese Verfahren können aber auch Produkte entstehen, die toxischer wirken als ihre Ursprungssubstanz (Vasconcelos *et al.*, 2009; Fatta-Kassinos, Vasquez und Kümmerer, 2011). Dadurch, dass die Synthese dieser Produkte sehr aufwendig

und kostspielig ist und diese Produkte auch nicht als Referenz-Standards bestellbar sind, müssen Verfahren zur Beurteilung der Ökotoxizität angewendet werden, die nachfolgend vorgestellt werden.

Experimentelle Bestimmung des ökotoxikologischen Potentials bei photoinduzierter Degradation mittels MHK

Zunächst wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) nach ISO 20776-1:2007 (EUCAST 2007) bestimmt. Der MHK ist die geringste Konzentration einer Substanz, die das Wachstum *in vitro* eines Mikroorganismus unterbindet. Demgegenüber beschreibt der Lowest Observed Effect Level (LOEL) die

niedrigste Konzentration, die eine statistisch messbare Wirkung auf den jeweiligen Organismus erzielt. Eine Übersicht über die MHK-Werte von Ciprofloxacin aus der Literatur ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: MHK-Werte von Ciprofloxacin

<i>Bacillus subtilis</i> /µg·mL ⁻¹	<i>Escherichia coli</i> /µg·mL ⁻¹	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> /µg·mL ⁻¹	<i>Pseudomonas fluorescens</i> /µg·mL ⁻¹	<i>Staphylococcus aureus</i> /µg·mL ⁻¹	Literatur
<0.10			<0.10		(Voigt <i>et al.</i> , 2019)
0.02	0.13	1.00		0.50	(Foroumadi <i>et al.</i> , 2003, 2005)
0.12	0.01	0.25		0.15	(Goyal and Jain, 2013; Jain <i>et al.</i> , 2016)
	0.02	0.25		0.12 - 0.50	(Andrews, 2001)
	0.12 - 0.24			7.68	(Sturini <i>et al.</i> , 2012)
		0.12		0.50	(EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017)

Sowohl gegen grampositive Mikroorganismen, wie zum Beispiel *Bacillus subtilis*, als auch gegen gramnegative Mikroorganismen, wie zum Beispiel *Pseudomonas fluorescens*, ist Ciprofloxacin wirksam.

Die ermittelten MHK-Werte können nun als Basis für die Berechnung der gegen den jeweiligen Mikroorganismus wirk-

same Zeit t_{akt} der Substanz eines Abbaus verwendet werden, siehe Gleichung 5.

$$t_{akt} = - \frac{\ln\left(\frac{MHK}{c_{A0}}\right)}{k_1} \quad \text{Gl. 5}$$

Die nun daraus resultierenden Aktivitätszeiten sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Wirksame Zeit t_{akt} von Ciprofloxacin gegen verschiedene Mikroorganismen; [t_{akt}]=min⁻¹

<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<12.6			<12.6	
16.4	12.0	7.1		8.8
12.2	18.1	10.4		11.6
	16.4	10.4		8.8 – 12.2
	10.5 – 12.2			2.3
		12.2		8.8

Innerhalb von 20 min UVC-Bestrahlung war keine Wirksamkeit von Ciprofloxacin gegen die untersuchten Mikroorganismen vorhanden. Eine weitere Möglichkeit um eine Abschätzung der Ökotoxizität vorzunehmen ist der Vergleich der MHK-Werte bei

unterschiedlichen Bestrahlungszeiten. Steigt der Wert an, so ist eine niedrigere Toxizität entstanden bzw. die gebildeten Produkte weisen eine niedrigere Ökotoxizität auf. Die Ergebnisse hierzu sind für Ciprofloxacin in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: MHK-Werte in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit

Mikroorganismus	MHK /mg L ⁻¹ bei Bestrahlungszeit X:					
	0 min	1 min	2.5 min	3.5 min	5 min	7 min
<i>Ps. fluorescens</i>	0.16	0.16	0.64	0.64	> 0.64	> 0.64
<i>B. subtilis</i>	0.08	0.16	0.64	0.64	> 0.64	> 0.64

Auch hier konnte nach 5 min UVC-Bestrahlung die Wirksamkeit gegen *Pseudomonas fluorescens* und *Bacillus subtilis* deutlich verringert werden. Alternativ zu den MHK-Werten kann

auch der IC₅₀-Wert verwendet werden (Niu, Glady-Croué und Croué, 2017; Hain, Wammer and Blaney, 2018; Voigt *et al.*, 2019).

Vorhersage des ökotoxikologischen Potentials mittels QSAR-Analyse

Mittels QSAR-Analyse wurde eine erste Abschätzung der Ökotoxizität der einzelnen gebildeten Produkte erhalten. Hierzu wurde aus bekannten Strukturen die Ökotoxizität bestimmt und daraus Modelle erstellt, um eine Ökotoxizitätsvorhersage für unbekannte Substanzen zu ermöglichen.

Für die in Abbildung 2 erhaltenen Substanzen wurde diese QSAR-Analyse für verschiedene Organismen mit der Software OECD QSAR Toolbox durchgeführt. Die Resultate sind in Tabelle 5 dargestellt. Bewertet wurden die Gesamtstrukturen bezüglich der Endpunkte, wobei die Untereinheit oder funktionelle Gruppe angegeben ist, auf die die Toxizität hauptsächlich zurückgeführt wurde.

Tabelle 5: QSAR-Analyse von Ciprofloxacin und der photoinduzierten Abbau- bzw. Transformationsprodukte

QSAR	Ciprofloxacin /mg L ⁻¹	Cip330 /mg L ⁻¹	Cip288 /mg L ⁻¹	Cip304 /mg L ⁻¹	Cip348 /mg L ⁻¹
DAPHNID 48 h LC50 Mortality Aliphatic Amines	1.24E+03	3.18E+03	4.99E+03	5.42E+03	2.54E+03
DAPHNID 48 h LC50 Mortality Vinyl/Allyl Ketones	1.40E+05	5.68E+05	1.18E+06	1.30E+06	3.96E+05
DAPHNID ChV Aliphatic Amines	81.2	193	289	313	158
DAPHNID ChV Vinyl/Allyl Ketones	1.40E+04	4.92E+04	9.35E+04	1.02E+05	3.58E+04
Fish (SW) 96 h LC50 Mortality Vinyl/Allyl Ketones	1.28E+07	9.00E+07	2.63E+08	2.95E+08	5.34E+07
Fish (SW) ChV Vinyl/Allyl Ketones	4.49E+05	1.71E+06	3.41E+06	3.75E+06	1.21E+06
FISH 96 h LC50 Mortality Aliphatic Amines	1.31E+04	3.65E+04	6.01E+04	6.53E+04	2.84E+04
FISH 96 h LC50 Mortality Vinyl/Allyl Ketones	1.13E+05	3.71E+05	6.77E+05	7.40E+05	2.75E+05
FISH ChV Aliphatic Amines	1.55E+03	5.49E+03	1.05E+04	1.15E+04	3.98E+03
FISH ChV Vinyl/Allyl Ketones	7.91E+04	3.46E+05	7.55E+05	8.33E+05	2.36E+05
GREEN ALGAE 96 h EC50 Aliphatic Amines	1.62E+03	4.87E+03	8.40E+03	9.16E+03	3.71E+03
GREEN ALGAE 96 h EC50 Growth Vinyl/Allyl Ketones	5.55E+04	1.97E+05	3.76E+05	4.12E+05	1.43E+05
GREEN ALGAE ChV Aliphatic Amines	455	1.29E+03	2.15E+03	2.34E+03	999
GREEN ALGAE ChV Vinyl/Allyl Ketones	7.68E+03	2.04E+04	3.27E+04	3.55E+04	1.61E+04
MYSID (SW) 96 h LC50 Mortality Vinyl/Allyl Ketones	2.69E+05	1.54E+06	3.96E+06	4.40E+06	9.71E+05
MYSID (SW) ChV Vinyl/Allyl Ketones	8.68E+04	6.75E+05	2.10E+06	2.35E+06	3.89E+05

Alle Produkte, die durch UV-Bestrahlung von Ciprofloxacin entstanden sind, weisen höhere Werte auf als Ciprofloxacin. Das bedeutet, dass die Wirkung der Produkte gegen die Organismen nachließ und somit die Wahrscheinlichkeit einer Umweltgefährdung abnahm. Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass die Datenlage in den Datenbanken unzureichend für eine verlässliche Aussage ist. Diese Analyse kann aber erste Hinweise geben, ob ein entstandenes Produkt toxischer oder weniger toxisch wirkt.

Schlussfolgerungen

Die UV-Bestrahlung eignet sich für die Eliminierung von Substanzen in Gewässern. Wie hier am Beispiel von Ciprofloxacin gezeigt wurde, nimmt nicht nur die Konzentration der Substanz durch UV-Bestrahlung ab, sondern auch ihre Ökotoxizität. Als Modell für die Abschätzung der Ökotoxizität lassen sich MHK-Werte gegen kompartimentrelevante Bakterien heranziehen. Die Werte korrelieren mit Bestrahlungshalbwertzeiten, sodass sich UV-Expositionszeiten für eine Abwasserbehandlung abschätzen lassen. Außerdem lässt sich die Ökotoxizität von

Substanzen und ihren Transformationsprodukten bei bekannter chemischer Struktur schnell und einfach mittels QSAR abschätzen. Dies erfordert jedoch eine umfangreichere Datenlage.

Referenzen

- Andrews, J. (2001) 'Determination of minimum inhibitory concentrations', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, pp. 5–16. doi: 10.1093/jac/48.suppl.
- Balakrishna, K. et al. (2016) 'A review of the occurrence of pharmaceuticals and personal care products in Indian water bodies', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137 (November), pp. 113–120. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.11.014.
- Commission Implementing Decision (EU) 2018/840 of 5 June 2018 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council and repealing Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 (notified under document C(2018) 3362).
- EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2007). Available at: www.eucast.org (Accessed: 31 January 2017).
- Fatta-Kassinos, D., Vasquez, M. I. and Kümmerer, K. (2011) 'Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes - degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency', *Chemosphere*, 85(5), pp. 693–709. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.06.082.
- Forumadi, A. et al. (2003) 'Synthesis and in vitro antibacterial evaluation of N-[5-(5-nitro-2-thienyl)-1,3,4-thiadiazole-2-yl] piperazinyl quinolones', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38(9), pp. 851–854. doi: 10.1016/S0223-5234(03)00148-X.
- Forumadi, A. et al. (2005) 'Synthesis and antibacterial activity of N-[2-(5-bromothiophen-2-yl)-2-oxoethyl] and N-[(2-5-bromothiophen-2-yl)-2-oximinoethyl] derivatives of piperazinyl quinolones', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 15(20), pp. 4536–4539. doi: 10.1016/j.bmcl.2005.07.005.
- Goyal, A. and Jain, S. (2013) 'Syntheses and antibacterial studies of some 1-phenyl-3-(4-(2-ethanoxo) phenyl)-5-aryl-1H-pyrazoles', *Journal of Chemistry* (2090-9063), DOI: 10.1155/2013/950491
- Hain, E., Wammer, K. H. and Blaney, L. (2018) 'Comment on " Photodegradation of sulfathiazole under simulated sunlight : Kinetics , photo-induced structural rearrangement , and antimicrobial activities of photoproducts " by Niu et al . [Water Research 124 2017 576 e 583]', *Water Research*, 131, pp. 205–207. doi: 10.1016/j.watres.2017.12.041.
- Jain, S. et al. (2016) 'Synthesis and antibacterial studies of 2-aryl-3-alkanamido-4H-thiazolidin-4-one derivatives', *Arabian Journal of Chemistry*. King Saud University, 9, pp. S290–S295. doi: 10.1016/j.arabjc.2011.04.009.
- Mauser, H. (1974) 'Formale Kinetik. Experimentelle Methoden der Physik und der Chemie [Formal Kinetics. Experimental Methods of Physics and Chemistry]', Düsseldorf: Bertelsmann-Universitätsverlag.
- Niu, X., Gladly-Croué, J. and Croué, J. (2017) 'Photodegradation of sulfathiazole under simulated sunlight: Kinetics, photo-induced structural rearrangement, and antimicrobial activities of photoproducts', *Water Research*, 124, pp. 576–583. doi: 10.1016/j.watres.2017.08.019.
- Sturini, M. et al. (2012) 'Photodegradation of fluoroquinolones in surface water and antimicrobial activity of the photoproducts', *Water Research*, 46(17), pp. 5575–82. doi: 10.1016/j.watres.2012.07.043.
- Vasconcelos, T. G. et al. (2009) 'Photo-degradation of the antimicrobial ciprofloxacin at high pH: Identification and biodegradability assessment of the primary by-products', *Chemosphere*, 76(4), pp. 487–493. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.03.022.
- Voigt, M. et al. (2019) 'Determination of minimum inhibitory concentration and half maximal inhibitory concentration of antibiotics and their degradation products to assess the eco-toxicological potential', *Toxicological & Environmental Chemistry*, 101(3–6), pp. 315–338. doi: 10.1080/02772248.2019.1687706.
- Voigt, M. et al. (2020) 'Prior art for the development of a fourth purification stage in wastewater treatment plant for the elimination of anthropogenic micropollutants - a short-review', *AIMS Environmental Science*, 7(1), pp. 69–98. doi: 10.3934/environsci.2020005.
- Voigt, M. and Jaeger, M. (2021) 'Structure and QSAR analysis of photoinduced transformation products of neonicotinoids from EU watchlist for ecotoxicological assessment', *Science of the Total Environment*, 751, p. 141634. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141634.
- Yang, Y. et al. (2017) 'Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review', *Science of the Total Environment*, 596–597, pp. 303–320. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.04.102.

Korrespondenzadresse

Dr. Melanie Voigt
Labor für organische Spurenanalytik, Fachbereich Chemie und ILOC-Institut
Hochschule Niederrhein
Frankenring 20
47798 Krefeld
Tel.: 02151 822 4039
E-Mail: melanie.voigt@hs-niederrhein.de