

Einfluss von Sonnenlicht auf den Abbau von Antibiotika in der aquatischen Umwelt: Kinetik, Umwandlung und Wirkung

zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN

von der KIT-Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik des
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
genehmigte

DISSERTATION

von
M. Sc. Alexander Timm
aus Oberhausen

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2019

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Harald Horn

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christian Zwiener

Zusammenfassung

Durch den weltweiten und jahrzehntelangen Einsatz von Antibiotika in der Human- und Tiermedizin gelangen große Mengen dieser Substanzen in die aquatische Umwelt, wo biotische und abiotische Faktoren sie in eine Vielzahl von Transformationsprodukte (TPs) umwandeln. Im Rahmen der Promotion wurde untersucht, ob Sonnenlicht Antibiotika in der aquatischen Umwelt abbauen kann und ob bei einem photolytischen Abbau die antibakterielle Wirkung der Antibiotika aufgehoben wird. Hierzu wurden vier β -Lactam-Antibiotika und zwei Oxazolidinon-Antibiotika mit simuliertem Sonnenlicht entsprechend der Lichtintensität unbewölkter Sommertage in Mitteleuropa bestrahlt. Ziel war, die Abbaukinetik zu bestimmen, die Molekülstrukturen der TPs zu entschlüsseln und die verbleibende Wirkung an Bakterien zu untersuchen.

Dabei zeigten sich β -Lactam-Antibiotika sehr reaktionsfreudig und wurden in Reinstwasser mit Halbwertszeiten kürzer als sieben Stunden abgebaut. Die Halbwertszeiten der Oxazolidinon-Antibiotika lagen bei 32 Stunden für Linezolid und 93 Stunden für Tedizolid. In natürlichem Oberflächenwasser hingegen wurde der photolytische Abbau von der Strahlungsabsorption durch organisches Material stark verlangsamt. Tedizolid konnte in Oberflächenwasser nicht durch Sonnenlicht abgebaut werden.

Die Strukturaufklärung der TPs mittels hochauflösender Tandem-Massenspektrometrie ergab, dass häufig das pharmazeutisch wirksame Zentrum (der β -Lactamring bzw. der Oxazolidinonring) durch Sonnenlicht verändert wurde, sodass diese TPs gegen Bakterien unwirksam sind. Penicillin V war das einzige β -Lactam-Antibiotikum, bei dem nach der Bestrahlung Epimere mit intaktem β -Lactamring entdeckt wurden. Weitere photolytisch induzierte Reaktionen der β -Lactam-Antibiotika waren die hydrolytische Öffnung des β -Lactamrings gefolgt von mehreren Kohlenstoff-Bindungsbrüchen.

Bei den Oxazolidinon-Antibiotika gab es deutliche Unterschiede zwischen Linezolid und Tedizolid. Bei Linezolid wurden überwiegend der Morpholinylring und der Fluorphenylring verändert, während bei Tedizolid der Oxazolidinonring Angriffspunkt vieler photolytischer Reaktionen war.

Im letzten Schritt wurde die antibakterielle Wirkung der photolytisch abgebauten Antibiotika als Wachstumshemmung an dem Bakterium *Bacillus subtilis* bestimmt. Bei allen Antibiotika ging deren Wirkung nach der Bestrahlung zurück. Penicillin V und Linezolid zeigten im Gegensatz zu den anderen Antibiotika eine deutliche Restwirkung nach der Bestrahlung, die wahrscheinlich aus antibakteriell wirksamen TPs resultiert. Demgegenüber zeigte ein weiterer Toxizitätstest, der die Biolumineszenzhemmung an *Aliivibrio fischeri* misst, dass Tedizolid nach der Bestrahlung stärker biochemische Prozesse in diesem Bakterium verhindern kann als vor der Bestrahlung. Bei den anderen Antibiotika konnte dies nicht beobachtet werden.

Summary

Due to the worldwide high consumption of antibiotics over decades in the human and veterinary medicine, large amounts of these substances were released to the aquatic environment. Here, microbial and abiotic factors cause the transformation of pharmaceuticals to multiple transformation products (TPs) with various ecological effects.

This study focuses on the photolytic transformation of β -lactam- and oxazolidinone antibiotics by sunlight under environmental conditions. The aim was to determine, if sunlight is able to degrade antibiotics in the aquatic environment and if this affects the antibacterial efficacy. Therefore, four β -lactam- and two oxazolidinone antibiotics were irradiated by simulated sunlight according to the light intensity of the mid-European summer to determine the degradation kinetics, to elucidate the chemical structures of TPs and to investigate the residual efficacy against bacteria.

All antibiotics abated in aqueous solutions exposed to irradiation by simulated sunlight. Especially the β -lactam antibiotics were highly reactive and degraded with half-lives between three and seven hours. Under the same conditions, oxazolidinone antibiotics were much more photostable with half-lives of 32 h and 93 h, for linezolid and tedizolid, respectively. The photolytic degradation kinetics in surface water were decelerated by the absorption of light by organic matter. Tedizolid was not degradable by simulated sunlight in surface water. The elucidation of the TPs by high-resolution tandem mass spectrometry showed that most photolytic reactions lead to a destruction of the molecule's antibacterial centre (β -lactam ring and oxazolidinone ring), which means a loss of the antibacterial activity. Two TPs of penicillin V were proposed to be epimers, which were the only probably antibacterial TPs of β -lactam antibiotics. Further transformations of β -lactam antibiotics were the hydrolytic opening of the β -lactam ring and subsequent breakages of carbon bonds.

Structure elucidation revealed difference photolytic transformations of linezolid and tedizolid. Linezolid was mainly transformed at the morpholinyl and fluorophenyl ring and most TPs of tedizolid showed changes in the oxazolidinone ring.

In the last step, the antibacterial efficacy of transformed antibiotics was measured on two different species of bacteria. The growth inhibition of *Bacillus subtilis* by all antibiotics decreased after irradiation. However, penicillin V and linezolid showed a residual fraction of the original antibacterial efficacy, which may result from antibacterial TPs with unchanged β -lactam- and oxazolidinone ring.

A further toxicity test measured the bioluminescence inhibition of *Aliivibrio fischeri*. It showed that the ability of tedizolid to inhibit biochemical processes in this bacterium increased after irradiation. This effect was absent for any of the other antibiotics.

Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Zeit von Dezember 2015 bis Dezember 2018 am Engler-Bunte-Institut und wurde sowohl von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) als auch vom Deutschen Verein des Gas- und Wasserfachs (DVGW) gefördert. Gelingen konnte dies nicht ohne die Hilfe Vieler, denen mein herzlichster Dank und tiefe Anerkennung für deren Mühe und deren Leistung gebührt.

Prof. Harald Horn danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und damit für die Möglichkeit, in einem instrumentell sehr gut ausgestatteten Umfeld zu arbeiten und in eine besonders heterogene Arbeitsgruppe einzutauchen, aus der ich viel Wissen jenseits meines geprägten Horizontes schöpfen konnte. Prof. Christian Zwiener danke ich unter anderem für seine Bereitschaft, Zweitprüfer dieser Dissertation zu sein.

Insbesondere bedanke ich mich bei Dr. Ewa Borowska, die mich durch meine Promotion begleitet hat und mir in vielen Aspekten mit Rat und Tat beiseite stand. Ihr Interesse an meiner Arbeit und die daraus resultierenden tiefgehenden Gespräche haben einen großen Beitrag zu dieser Dissertation beigetragen.

Weiterhin möchte ich mich auch bei Dr. Marius Majewsky bedanken, der für mich eine große Hilfe zu Beginn meiner Dissertation war und darüber hinaus die Möglichkeit für Messungen an einem hochauflösenden Massenspektrometer am Universitätsklinikum Heidelberg arrangiert hat. Für weitere Messungen an hochauflösenden Massenspektrometern bedanke ich mich bei Prof. Christian Zwiener und Dr. Sylvain Merel von der Eberhart-Karls-Universität Tübingen sowie bei Dr. László Tölgyesi von Agilent Technologies.

Ebenso bedanke ich mich bei Dr. Thomas Glauner von Agilent Technologies für die enge Zusammenarbeit, die zum Entstehen einer Application Note geführt hat.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinen Studenten Mingjiao Zheng und Patrick Abendschön, die mit Ihren Studien einen hervorragenden Beitrag zu diesem Forschungsprojekt geleistet haben.

Bei Rafael Peschke bedanke ich mich für die fruchtbare und kollegiale Zusammenarbeit im Labor. Luisa Gierl und Antje Decker danke ich für die Hilfe im Umgang mit Bakterien. Matthias Weber danke ich für die DOC-Messungen und für die Zeit, über die Analytik zu sprechen. Prof. Stefan Bräse und Danny Wagner danke ich für die Bereitschaft, Substanzen zu synthetisieren, die ohne ihre Hilfe kaum erhältlich gewesen wären.

Letztendlich bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Engler-Bunte-Instituts, die die Zeit meiner Promotion zu drei wunderbaren und interessanten Jahren gemacht haben, auf die ich in Zukunft mit großer Freude zurückblicken darf.

Liste von Symbolen und Abkürzungen

AMP	A mpicillin
AMX	A moxicillin
CSB	chemischer S auerstoff b edarf
DNS	D esoxyribonucleinsäure
DOC	gelöste organische Materie (englisch: d issolved o rganic c arbon)
h	Stunde (englisch: h our)
h·v	Planksches Wirkungsquantum mal Frequenz (Bestrahlung)
LC	Flüssigchromatographie (englisch: l iquid c hromatography)
LIN	L inezolid
LIN-D3	L inezolid mit 3 D euteriumisotopen
LOQ	Nachweisgrenze (englisch: L imit o f q uantification)
MHK	m inimale H emm k onzentration
MS	M assenspektrometrie
MS/MS	Tandem- M assenspektrometer
MS ²	Tandem- M assenspektrum
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
n	Anzahl an Messungen
NTU	Trübungseinheit (englisch: n ephelometric t urbidity u nit)
OD ₆₀₀	o ptische D ichte bei $\lambda = 600$ nm
OW	O berflächen w asser
p.a.	Analysegrad (latein: p ro a nalyse)
PEN	P enicillin V (Phenoxymethylpenicillin)
PEN-D5	P enicillin V mit 5 D euteriumisotopen
PIP	P iperacillin
QToF	Tandemmassenspektrometer mit einem Quadrupol und einem Flugzeitmassenspektrometer (englisch: Q uadrupol- T ime o f F light)
RNS	R ibonucleinsäure
rRNS	ribosomale R ibonucleinsäure
RW	R einst w asser
s	S tandardabweichung
t	T onne (1.000 kg)
t _{1/2}	Halbwertszeit (englisch: t ime)
TED	T edizolid
TED-D3	T edizolid mit 3 D euteriumisotopen
TOC	gesamter organischer Kohlenstoff (englisch: t otal o rganic c arbon)
TP	T ransformations p rodukt

t_R	Retentionszeit (englisch: retention time)
UV	ultraviolett
UV ₂₅₄	ultraviolett bei $\lambda = 254$ nm
UV/Vis	ultraviolett und sichtbar (englisch: ultraviolet-visible)
λ	Wellenlänge elektromagnetischer Strahlung
σ	zur Bindungsachse rotationssymmetrisches Molekülorbital aus zwei der Überlappung zweier Hybridorbitale bei einer Einfachbindung
σ^*	antibindendes σ -Orbital
π	Molekülorbital aus der Überlappung zweier p_z -Orbitale bei einer Doppel- oder Dreifachbindung
π^*	antibindendes π -Orbital

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.2:	Haupteintragswege von Antibiotika der Human- und Tiermedizin (Küster et al., 2013, bearbeitet).	7
Abb. 1.2.1:	Strukturformel von PEN.	12
Abb. 1.3.1a:	Strukturformel von LIN.	15
Abb. 1.3.1b:	Strukturformel von TED.	15
Abb. 1.4.2:	Physikalische und chemische Formen der Relaxation von Elektronen (Calvert und Pitts, 1967; Turro, 1991, bearbeitet).	19
Abb. 1.5.1:	Spektrum des Sonnenlichts (Mangold et al., 2013, bearbeitet).	22
Abb. 1.5.2:	Durchschnittliche Sonnenintensität in Deutschland (städtebauliche Klimafibel).	23
Abb. 2.2a:	Anteil des organischen Eluenten der chromatographischen Methoden A und B.	26
Abb. 2.2b:	Chromatogramm mit 100 ng/L von vier β -Lactam-Antibiotika.	28
Abb. 2.2c:	Chromatogramm mit 100 ng/L LIN und TED.	29
Abb. 2.3.1a:	Schematische Zeichnung des Sonnenlichtsimulators.	30
Abb. 2.3.1b:	Emissionsspektrum des Newport 3A Sonnenlichtsimulators.	30
Abb. 3a:	UV/Vis-Spektren der vier β -Lactam-Antibiotika, 2 mg/L.	35
Abb. 3b:	UV/Vis-Spektren von LIN und TED, 2 mg/L.	36
Abb. 3.1.1:	Abbaukurven von β -Lactam-Antibiotika unter simuliertem Sonnenlicht (1 kW/m^2) in Reinstwasser bei 19° C , Fehlerbalken=1s, n=6.	37
Abb. 3.1.2:	Abbaukurven von Oxazolidinon-Antibiotika unter simuliertem Sonnenlicht (1 kW/m^2) in Reinstwasser bei 19° C , Fehlerbalken=1s, n=12.	38
Abb. 3.2.1:	Reaktionskonstanten pseudoerster Ordnung des Abbaus von β -Lactam-Antibiotika in Oberflächenwasser (OW 1: Rhein, OW 2: Alb) mit und ohne Bestrahlung durch simuliertes Sonnenlicht (1 kW/m^2) bei 19° C , Fehlerbalken=1s, n=4.	42
Abb. 3.2.2:	Reaktionskonstanten pseudoerster Ordnung des Abbaus von Oxazolidinon-Antibiotika in Reinstwasser und Oberflächenwasser (OW 1: Rhein, OW 2: Alb) mit und ohne Bestrahlung durch simuliertes Sonnenlicht (1 kW/m^2) 19° C , Fehlerbalken=1s, n=6.	44
Abb. 4.1.1:	Photolytisch angeregte Epimerisierung von PEN.	47
Abb. 4.1.2a:	Öffnung des β -Lactamrings.	48
Abb. 4.1.2b:	Konzentration von PEN und von PEN TP1 während einer Bestrahlung durch simuliertes Sonnenlicht, $k_{\text{Bildung}} = 0,16 \text{ 1/h}$, $k_{\text{Abbau}} = 0,64 \text{ 1/h}$.	48
Abb. 4.1.3:	Decarboxylierung von TPs 1 zu TPs 2.	49

Abb. 4.1.4:	Abspaltung von Dimethylthiazolidinsäure.	50
Abb. 4.1.5a:	Bildung von PIP TP4.	51
Abb. 4.1.5b:	Konzentration von PIP und von PIP TP4 während einer Bestrahlung durch simuliertes Sonnenlicht, $k_{\text{Bildung}} = 0,32 \text{ 1/h}$, $k_{\text{Abbau}} = 0,32 \text{ 1/h}$.	51
Abb. 4.1.6:	Reaktionswege des Abbaus von PIP durch direkte Photolyse.	52
Abb. 4.2.1:	Öffnung des Morpholinylrings.	54
Abb. 4.2.2:	Defluorierung des Fluorphenylrings.	55
Abb. 4.2.3:	Substitution von Fluor durch eine Hydroxygruppe.	55
Abb. 4.2.4:	Dehydrierung des Morpholinylrings zu einem Dihydroxy-Oxazinring und Defluorierung des Phenylrings.	56
Abb. 4.2.5:	Oxidative Öffnung des Dihydroxy-Oxazinrings.	57
Abb. 4.2.6:	Decarbonylierung.	58
Abb. 4.2.7:	Abspaltung des Oxazolidinonrings zu LIN TP7.	58
Abb. 4.2.8a:	Reaktionswege des Abbaus von LIN durch direkte Photolyse.	59
Abb. 4.2.8b:	Peakflächen von LIN und LIN TP1-7 in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer.	60
Abb. 4.3.1:	Oxidation des Pyridinylrings.	61
Abb. 4.3.2:	Oxidation des Oxazolidinonrings zu TED TP2.	62
Abb. 4.3.3:	Substitution von Fluor durch eine Hydroxylgruppe am Phenylring.	62
Abb. 4.3.4:	Abspaltung des Oxazolidinonrings zu TED TP4.	63
Abb. 4.3.5:	Bildung von TED TP5.	63
Abb. 4.3.6a:	Reaktionswege des Abbaus von TED durch direkte Photolyse.	64
Abb. 4.3.6b:	Peakflächen von TED und TED TP1-5 in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer.	65
Abb. 5.1.1:	Wachstumshemmung durch UV ₂₅₄ -bestrahlte β -Lactam-Antibiotika an <i>Bacillus subtilis</i> innerhalb von 8 h in Nährmedium, n=3, Standardabweichung <30%.	67
Abb. 5.2.1:	Wachstumshemmung durch UV ₂₅₄ -bestrahlte Oxazolidinon-Antibiotika an <i>Bacillus subtilis</i> innerhalb von 8 h in Nährmedium, n=3, Standardabweichung <5%.	70
Abb. 5.2.2:	Leuchthemmung durch UV ₂₅₄ -bestrahlte Oxazolidinon-Antibiotika an <i>Aliivibrio fischeri</i> gemäß DIN EN ISO 11348-2, n=1.	71

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1.1:	Verkauf von Antibiotika für die landwirtschaftliche Tierhaltung (Germap, 2015).	5
Tab. 1.1.2:	Antibiotikakonzentrationen im Rhein [ng/L], n=7 (BLAC, 2003).	8
Tab. 1.4.1:	Einteilung des Spektrums elektromagnetischer Wellen und deren Einfluss auf Teilchen (Atkins und de Paula, 2006; Christian, 2004).	18
Tab. 2.1:	Übersicht über die verwendeten Chemikalien.	25
Tab. 2.2.3:	MS ² -Massenübergänge der Analyten.	27
Tab. 2.5:	Für das Suspect-Screening berechnete Massenänderungen.	32
Tab. 3.1.3:	Vergleich der photolytischen Abbaukonstanten von Antibiotika unter simuliertem Sonnenlicht.	40
Tab. 3.2.1:	Physikalische und chemische Eigenschaften der verwendeten Oberflächenwässer für die Untersuchung der Photolyse von β -Lactam-Antibiotika.	42
Tab. 3.2.2:	Physikalische und chemische Eigenschaften der verwendeten Oberflächenwässer für die Untersuchung der Photolyse von Oxazolidinon-Antibiotika.	44

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1 Wirkung von Antibiotika	4
1.1.1 Verbrauch an Antibiotika	4
1.1.2 Eintragspfade von Antibiotika in die aquatische Umwelt	6
1.1.3 Risiken für die aquatische Umwelt durch Antibiotika	8
1.1.4 Abbau und Umwandlung von Antibiotika in der aquatischen Umwelt	10
1.2 β -Lactam-Antibiotika	11
1.2.1 Wirkmechanismus von β -Lactam-Antibiotika	12
1.2.2 Verbrauch von β -Lactam-Antibiotika	13
1.2.3 Verhalten von β -Lactam-Antibiotika in der aquatischen Umwelt	13
1.3 Oxazolidinon-Antibiotika	14
1.3.1 Wirkmechanismus von Oxazolidinon-Antibiotika	14
1.3.2 Verhalten von Oxazolidinon-Antibiotika in der aquatischen Umwelt	16
1.4 Photochemie von Mikroschadstoffen	17
1.4.1 Absorption elektromagnetischer Strahlung	17
1.4.2 Photolytische Anregung und Relaxation der Elektronen	18
1.4.3 Kinetik photolytischer Reaktionen	19
1.4.4 Indirekte Photolyse	20
1.4.5 Absorption von Licht in natürlichen Gewässern	21
1.5 Sonnenlicht	21
1.5.1 Spektrum des Sonnenlichts	21
1.5.2 Intensität des Sonnenlichts	22
1.5.3 Photochemische Reaktionen durch Sonnenlicht	23
1.6 Ziel der Forschung	24
2. Material und Methoden	25
2.1 Chemikalien	25
2.2 Quantifizierung der Antibiotika	26
2.3 Bestrahlungsexperimente	29
2.3.1 Experimente mit simuliertem Sonnenlicht	29
2.3.2 Experimente mit UV ₂₅₄ -Strahlung	31
2.4 Kinetische Untersuchungen	31
2.5 Strukturaufklärung der Transformationsprodukte	32
2.6 Toxizitätstests	33
2.6.1 Messung der Wachstumshemmung an <i>Bacillus subtilis</i>	33
2.6.2 Messung der Biolumineszenzhemmung von <i>Aliivibrio fischeri</i>	34

3. Kinetik der Photolyse von Antibiotika unter simuliertem Sonnenlicht	35
3.1 Abbaukinetik unter simuliertem Sonnenlicht in Reinstwasser	36
3.1.1 Abbaukinetik von β -Lactam-Antibiotika in Reinstwasser	37
3.1.2 Abbaukinetik von Oxazolidinon-Antibiotika in Reinstwasser	39
3.1.3 Vergleich der direkten Photolyse verschiedener Antibiotika	40
3.2 Abbaukinetik unter simuliertem Sonnenlicht in Oberflächenwasser	41
3.2.1 Abbaukinetik von β -Lactam-Antibiotika in Oberflächenwasser	42
3.2.2 Abbaukinetik von Oxazolidinon-Antibiotika in Oberflächenwasser	44
4. Strukturaufklärung von Transformationsprodukten	46
4.1 Photolytische Umwandlung von β -Lactam-Antibiotika	46
4.1.1 Epimerisierung von PEN	46
4.1.2 Öffnung des β -Lactamrings	47
4.1.3 Decarboxylierung	49
4.1.4 Abspaltung von Dimethyl-thiazolidinsäure	50
4.1.5 Bildung von 1-Ethylpiperazin-2,3-dion	50
4.1.6 Übersicht der photolytischen Umwandlung von β -Lactam-Antibiotika	52
4.2 Photolytische Umwandlung von Linezolid	54
4.2.1 Öffnung des Morpholinyrings	54
4.2.2 Defluorierung des Phenylrings	54
4.2.3 Substitution von Fluor durch eine Hydroxygruppe	55
4.2.4 Dehydrierung des Morpholinyrings mit Defluorierung	55
4.2.5 Oxidative Öffnung des Morpholinyrings	57
4.2.6 Decarbonylierung	57
4.2.7 Abspaltung des Oxazolidinonrings	58
4.2.8 Übersicht der photolytischen Umwandlung von Linezolid	59
4.3. Photolytische Umwandlung von Tedizolid	61
4.3.1 Oxidation des Pyridinyrings	61
4.3.2 Oxidation des Oxazolidinonrings	62
4.3.3 Substitution von Fluor durch eine Hydroxygruppe	62
4.3.4 Abspaltung des Oxazolidinonrings	63
4.3.5 Abspaltung des Pyridinyrings	63
4.3.6 Übersicht der photolytischen Umwandlung von Linezolid	64
5. Toxizität photolytisch abgebauter Antibiotika	66
5.1. Toxizität der β -Lactam-Antibiotika	66
5.1.1 Wachstumshemmung von <i>Bacillus subtilis</i>	67
5.1.2 Leuchthemmung von <i>Aliivibrio fischeri</i>	68
5.2 Toxizität der Oxazolidinon-Antibiotika	69

5.2.1 Wachstumshemmung von <i>Bacillus subtilis</i>	69
5.1.2 Leuchthemmung von <i>Aliivibrio fischeri</i>	71
6. Fazit	73
7. Quellenverzeichnis	75

1. Einleitung

Seitdem Alexander Fleming 1928 Penicillin G als erste antibakteriell wirksame Substanz in Schimmelpilzen entdeckte, gehören Antibiotika zu den wichtigsten Medikamenten der Human- und Tiermedizin. Antibiotika sind Substanzen, die infektiöse Mikroorganismen im Wachstum hemmen (bakteriostatisch) oder töten (bakterizid) und dabei dem Wirtsorganismus möglichst wenig schaden (Bhattacharjee, 2016). Aufgrund der Notwendigkeit dieser Substanzen bei der Behandlung und Vorbeugung bakterieller Infektionen werden Antibiotika seit Jahrzehnten in großen Mengen eingesetzt, was weltweit zu einem beachtlichen Eintrag in die aquatische Umwelt führt und dadurch viele umweltchemische Fragen mit sich bringt.

1.1 Wirkung von Antibiotika

Antibiotika bieten eine sehr wirksame und schnelle Möglichkeit, bakterielle Infektionen zu behandeln und können damit insbesondere bei Erkrankungen wie Tuberkulose, Wundbrand, Pest oder Typhus lebensrettend sein. Neben der Behandlung bakterieller Erkrankungen finden Antibiotika auch Anwendung in der Prävention von Infektionen nach invasiven medizinischen Operationen (Diekema und Jones, 2001). Ebenso in der industriellen Tierhaltung werden Antibiotika zur Behandlung und zur Prävention bakterieller Infektionen verabreicht (Gonzalez Ronquillo und Angeles Hernandez, 2017).

Je nach zu bekämpfendem Bakterium und Wirkungsort wurden verschiedene Antibiotikaklassen entwickelt, sodass mittlerweile rund 200 verschiedene Antibiotika für die Behandlung verschiedenster Infektionen zur Verfügung stehen (Günther et al., 2003).

Im Wesentlichen unterscheiden sich die Antibiotikaklassen in ihren Wirkmechanismen, die auf verschiedene Zielstrukturen in der Zelle wirken. Einige Antibiotikaklassen verhindern den Aufbau der Zellwand (z.B. β -Lactam-Antibiotika) oder der Zellmembran, andere verhindern die Folsäureproduktion (z.B. Sulfonamid-Antibiotika und Trimethoprim), die ribosomale Proteinsynthese (z.B. Makrolid-, Tetracyclin-, Oxazolidinon-Antibiotika und Chloramphenicol), die Replikation der DNS oder die Transkription der RNS (z.B. Fluorchinolon-Antibiotika) (Bhattacharjee, 2016; Gualerzi et al., 2013).

1.1.1 Verbrauch an Antibiotika

Aufgrund des häufigen Einsatzes hat der Antibiotikaverbrauch weltweit beträchtliche Mengen angenommen. 2010 wurde die Gesamtmenge der weltweit verabreichten Antibiotika auf über 63.000 t geschätzt, wovon 80% der Tiermedizin zugeschrieben werden und der Verbrauch voraussichtlich weiter steigen wird (van Boeckel et al., 2015). 2009 wurden 571 t an Antibiotika allein für die deutsche Humanmedizin ärztlich verordnet, was einem Durchschnitt von 7g pro Person und Jahr entspricht und einen steigenden Trend zeigt (Bergmann et al.,

1. Einleitung

2011). Nach einer Berechnung von Günther et al. (2003) werden in Deutschland jährlich mehr als 40 Millionen ärztliche Verschreibungen von Antibiotika ausgestellt. Im Vergleich zu anderen europäischen Ländern ist der deutsche Verbrauch an Humanantibiotika mit 13,6 Tagesdosen auf 1.000 Einwohner (im Vergleich Frankreich: 36,5 Tagesdosen auf 1.000 Einwohner) eher gering (Cars et. al., 2001; Germap, 2015).

β -Lactam-Antibiotika gehören mit 50% Marktanteil zu den wichtigsten Antibiotika der Humanmedizin (Elander, 2003). Zu den weiteren Antibiotikaklassen mit hohem Verbrauch gehören Sulfonamid-, Makrolid-, Aminoglycosid- und Polypeptid-Antibiotika. Dabei werden 54% aller Antibiotika von Hausärzten verschrieben, gefolgt von Internisten (12%) und Kinderärzten (10%). Die restlichen 24% verteilen sich auf HNO-Ärzte, Urologen, Hautärzte, Gynäkologen und Weiteren (Günther et al., 2003). Wie erwähnt, wird zusätzlich ein deutlich größerer Anteil an Antibiotika in der Tiermedizin eingesetzt. 2014 wurden für die Tiermedizin 1.238 t Antibiotika in Deutschland verkauft, wobei der Trend für die Antibiotikavergabe deutscher Tierhaltung deutlich rückläufig ist. 2011 waren es noch 1.706 t (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2016). Tab. 1.1.1 listet den Verkauf einzelner Antibiotikaklassen für die deutsche Landwirtschaft auf.

Tab. 1.1.1: Verkauf von Antibiotika für die landwirtschaftliche Tierhaltung (Germap, 2015).

Antibiotikaklasse	Menge 2014 [t]
Tetracyclin-Antibiotika	342
β -Lactam-Antibiotika (ohne Cephalosporine)	450
Sulfonamid-Antibiotika	121
Makrolid-Antibiotika	109
Polypeptid-Antibiotika	107
Cephalosporine	5,8

Mit dem gestiegenen Verbrauch von Antibiotika ging jedoch nicht nur ein Gewinn der menschlichen Gesundheit einher, sondern auch eine vermehrte bakterielle Resistenz gegen diese Substanzen. Infektionen durch resistente bzw. multiresistente Bakterien sind sehr schwer zu behandeln und stellen die Medizin vor große Herausforderungen. Um der Entwicklung und Verbreitung resistenter Pathogene entgegenzuwirken, sollte der Verbrauch an Antibiotika möglichst geringgehalten werden (Günther et al., 2003).

1. Einleitung

1.1.2 Eintragspfade von Antibiotika in die aquatische Umwelt

Nach der Einnahme werden Antibiotika wie andere Pharmazeutika teilweise metabolisiert über den Harn oder den Kot ausgeschieden. Insbesondere sind Krankenhäuser eine der wesentlichen Quellen solcher Mikroschadstoffe. In Krankenhausabwasser wurden einige Antibiotika in besonders hohen Konzentrationen von bis zu 101 µg/L für Ciprofloxacin, 29 µg/L für Clarithromycin, 90 µg/L für Metronidazol und 17 µg/L für Sulfamethoxazol nachgewiesen (Mauer et al., 2011). Antibiotika und deren Transformationsprodukte (TPs) gelangen mit dem Abwasser von Privathaushalten und Krankenhäusern zunächst in kommunale Kläranlagen, von wo sie bei unvollständigem Abbau in die aquatische Umwelt gelangen (Kümmerer und Henninger, 2003). Solche Mikroschadstoffe werden in einer klassischen dreistufigen Kläranlage meist nur unvollständig entfernt. Einige Antibiotika wie Trimethoprim oder Roxithromycin werden während der Abwasserklärung kaum abgebaut (BLAC, 2003). Sulfonamid-Antibiotika bleiben während der Klärung zu 5 bis 50% erhalten, wobei die restlichen 50-95% als TPs in die aquatische Umwelt gelangen (Majewsky et al., 2018). Während die Antibiotika aus der Humanmedizin mit dem Abwasser in die Kläranlagen gelangen, werden Antibiotika aus der Tiermedizin in der Regel mit der Gülle auf landwirtschaftlich genutzten Feldern verteilt (Alexy, 2003; Carvalho und Santos, 2016; Pan und Chu, 2017). Von hier können die Antibiotika aus der Tiermedizin in Oberflächengewässer gelangen oder in das Grundwasser versickern. Während Antibiotika die Eintragspfade in die aquatische Umwelt durchlaufen, unterliegen sie verschiedenen biotischen und abiotischen Faktoren, die zum Abbau der Substanzen führen können. Daher befinden sich in der aquatischen Umwelt neben den Antibiotika noch eine Vielzahl bekannter und unbekannter TPs. Abb. 1.1.2 zeigt die einzelnen Schritte der Eintragswege von Antibiotika aus der Human- und Tiermedizin in die aquatische Umwelt.

1. Einleitung

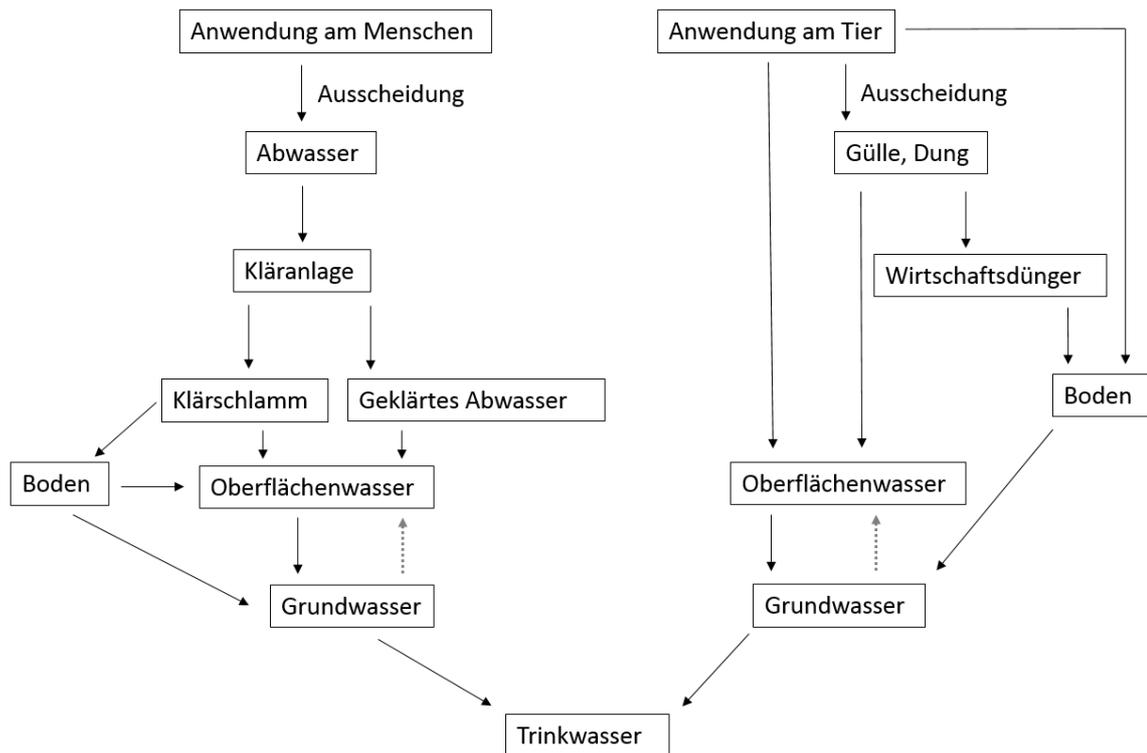


Abb. 1.1.2: Haupteintragswege von Antibiotika der Human- und Tiermedizin (Küster et al., 2013, bearbeitet).

Sowohl die Antibiotika der Humanmedizin als auch der Tiermedizin erreichen letztendlich das Oberflächen- und Grundwasser, von wo aus das Rohwasser für die Trinkwassergewinnung geschöpft wird (Alexy, 2003; Gawel, 2015). Die Konzentrationen von Antibiotika und anderen Pharmazeutika in den meisten Oberflächengewässern liegen im ng/L-Bereich. Eine Studie des Bund- und Länderausschusses für Chemikaliensicherheit wies Makrolid-, Sulfonamid-, β -Lactam-, Fluorchinolon- und Tetracyclin-Antibiotika sowie Trimethoprin in Klärwerksabläufen und Flüssen nach. Sulfamethoxazol zeigte in ungeklärtem Abwasser dabei die höchsten Konzentrationen mit einem Median von 390 ng/L und einem Maximum von 9 μ g/L. Nach der Klärung betrug der Median 330 ng/L und das Maximum 4,6 μ g/L. Kein weiteres Antibiotikum zeigte eine Konzentration über 500 ng/L nach der Klärung. Einige Konzentrationen unterschritten die Bestimmungsgrenze (LOQ, Limit of quantification). Tab. 1.1.2 gibt einen Überblick zu den Antibiotikakonzentrationen im Rhein (BLAC, 2003).

1. Einleitung

Tab. 1.1.2: Antibiotikakonzentrationen im Rhein [ng/L], n=7 (BLAC, 2003).

	Karlsruhe		Kleve	
	Median	Maximum	Median	Maximum
Clarithromycin	< LOQ	11	4	7
Erythromycin	< LOQ	32	15	76
Roxithromycin	< LOQ	< LOQ	< LOQ	12
Sulfadimidin	< LOQ	< LOQ	< LOQ	145
Sulfamethoxazol	19	20	36	106
Trimethoprim	< LOQ	< LOQ	5	25

In Tab. 1.1.2 lässt sich erkennen, dass stromabwärts in Kleve höhere Konzentrationen an Antibiotika gemessen wurden. Insbesondere das Ballungsgebiet der Rhein-Ruhr-Metropole kann als Ursache erhöhter Konzentrationen anthropogener Mikroschadstoffe im Niederrhein in Frage kommen. Bei der Angabe solcher Konzentrationen ist zu beachten, dass sich Antibiotika während der Abwasserklärung und danach weiterhin in TPs umwandeln. Auch wenn in den wenigsten Studien Konzentrationen von TPs angegeben werden, haben diese eine hohe Relevanz für Umweltchemie und -toxikologie.

Aufgrund der unzureichenden Eliminationsrate von Mikroschadstoffe in der kommunalen Abwasserklärung könnte der dreistufige Klärprozess durch eine vierte Reinigungsstufe ergänzt werden. Insbesondere eignen sich hierzu hinsichtlich der Anwendbarkeit und Wirkungsbreite Adsorption an Aktivkohle sowie oxidative Prozesse mit Ozon (Gawel et al., 2015; Hillenbrand et al., 2014; Rechenberg, 2015). Darüber hinaus könnte auch das Abwasser von Krankenhäusern und Pflegeheimen, das neben hohen Konzentrationen an Pharmazeutika auch viele antibiotika-resistente Bakterien enthält, separat durch Ultrafiltration in Kombination mit UV-Strahlung und/oder Ozon behandelt werden (Hüser, 2018; Mauer, 2011).

1.1.3 Risiken für die aquatische Umwelt durch Antibiotika

Der Einfluss von Antibiotika auf die Entwicklung und Verbreitung von bakteriellen Resistenzen steht im Mittelpunkt umweltmikrobiologischer Forschung. Die Resistenz eines Bakteriums gegen ein Antibiotikum kann zum einen durch zufällige Mutation oder durch die Aufnahme von bereits bestehenden Resistenzgenen (horizontaler Gentransfer) erfolgen. Der Austausch von Genmaterial kann auch zwischen verschiedenen Spezies beobachtet werden (Gualerzi et al., 2013). In Gegenwart von Antibiotika werden nicht-resistente Bakterien abgetötet oder am Wachstum gehindert, sodass es durch den Selektionsdruck zur Vermehrung der resistenten Bakterien kommt. Es sind drei wesentliche Resistenzstrategien bekannt:

1. Einleitung

- Bakterien können durch eine Veränderung der Zellhülle die Penetration des Antibiotikums in die Zelle verhindern.
- Antibiotika können enzymatisch (z.B. durch β -Lactamasen) inaktiviert werden.
- Bakterien können den Wirkungsort (z.B. die Zellwand oder die Ribosome) an die Antibiotika anpassen.

Insbesondere sind gegen Aminoglykosid- und β -Lactam-Antibiotika Resistenzformen aller drei Strategien bekannt (Günther et al., 2003).

Resistenzen gegen natürlich vorkommende Antibiotika wie das von dem *Penicillium*-Pilz produzierte Penicillin G konnten sich bereits vor der medizinischen Verwendung der Antibiotika entwickeln. Daher sind eine Reihe von natürlichen Resistenzgenen in der Umwelt weit verbreitet. Dem gegenüber existieren synthetische und halbsynthetische Antibiotika erst seit einigen Jahren oder Jahrzehnten. Resistenzen gegen diese Antibiotika treten in der Umwelt daher seltener auf (Bhattacharjee, 2016).

Die Antibiotikakonzentrationen in der aquatischen Umwelt unterschreiten jedoch in der Regel die minimale Hemmkonzentration (MHK) und sind damit zu gering, um antibakteriell zu wirken. Damit üben sie keinen direkten Selektionsdruck auf die Bakterien aus. Die MHK ist die geringste Konzentration, bei der ein Antibiotikum bakteriostatisch auf eine Bakterienspezies wirkt (Bhattacharjee, 2016). Die Wirkung von Antibiotika unterhalb der MHK wird von Mikrobiologen kontrovers diskutiert (Davies et al., 2006). Selbst bei Antibiotikakonzentrationen, die die MHK hundertfach unterschreiten und teilweise im ng/L-Bereich liegen, wurde ein Einfluss auf die DNS-Transkription festgestellt (Davies et al., 2006; Gulberg et al., 2011).

Resistente Bakterien wurden bisher nicht nur in Krankenhausabwasser, sondern auch in kommunalen Klärwerksabläufen entdeckt (Alexander et al., 2015; Schwartz et al., 2003). Insbesondere wurden ampicillin-resistente Bakterien bereits kontinuierlich in Oberflächenwasser mit Zufluss von geklärtem Abwasser nachgewiesen (Akiyama und Savin, 2010). Brown et al. (2019) zeigten, dass in Flusssedimenten nach dem Zulauf von geklärtem Abwasser vermehrt antibiotika-resistente Bakterien und Resistenzgene auftreten.

Häufig versagen Antibiotika bei der Behandlung von Infektionen durch resistente und multiresistente Bakterien, weswegen solche Infektionen die Medizin vor große Herausforderungen stellen. Hierdurch ergibt sich die Brisanz sowohl für die Umweltchemie als auch für die Medizin. Damit ist eine detaillierte Evaluierung des umweltchemischen Verhaltens von Antibiotika mit Hinblick auf Abbaukinetik, chemischen Abbaureaktionen sowie einer Beurteilung der Toxizität von TPs erforderlich, um in Zukunft die Abwasserklärung hinsichtlich der Eliminierung von Mikroschadstoffen, deren TPs und resistenten Bakterien zu optimieren.

1. Einleitung

1.1.4 Abbau und Umwandlung von Antibiotika in der aquatischen Umwelt

Lange Zeit standen quantitative Messungen von Mikroschadstoffen im Mittelpunkt umweltchemischer Forschung. Jedoch kann das umweltchemische Verhalten einer Substanz nicht allein über die Konzentration beschrieben werden. Antibiotika durchlaufen eine Vielzahl verschiedener Abbauprozesse während der Metabolisierung im Körper, im Klärwerk und zuletzt in der aquatischen Umwelt, die zur Bildung von TPs führen. Im Idealfall mineralisieren Mikroschadstoffe über verschiedene biotische und abiotische Abbauwege vollständig zu anorganischen Molekülen wie Kohlendioxid, Wasser und Nitrat (Schwarzenbach et al., 2003).

Zu den abiotischen Abbauprozessen zählen unter anderem Photolyse, Hydrolyse und Redoxreaktionen. Die Abbaukinetik ist von verschiedenen Parametern abhängig, insbesondere von der Temperatur und vom pH-Wert (Schwarzenbach et al., 2003). Kapitel 1.4 geht näher auf den photolytischen Abbau ein. Die TPs, die bei diesen Prozessen entstehen, unterscheiden sich von den Ausgangssubstanzen nicht nur in der chemischen Struktur, sondern auch in ihrer Wirkung. Daher richtet sich die umweltchemische Forschung zunehmend auf die Strukturaufklärung von TPs und auf die Untersuchung derer Wirkung auf lebende Organismen. Aufgrund der Vielzahl von Mikroschadstoffen wie Pestizide, Kosmetika, Lebensmittelzusatzstoffen und Industriechemikalien, die sich in nochmal deutlich mehr TPs umwandeln (Lapworth et al., 2012), liegt hierin eine der wesentlichen Herausforderungen gegenwärtiger umweltchemischer Forschung. Zu den wichtigsten Methoden zur Strukturaufklärung von TPs zählt vornehmlich die hochauflösende Tandem-Massenspektrometrie in Kombination mit Flüssigchromatographie (LC-MS/MS). Weitere Methoden zur Strukturaufklärung wie NMR- und IR-Spektroskopie finden aufgrund der geringeren Empfindlichkeit selten Anwendung. Alle diese Methoden geben Informationen über die Anordnung der Atome in einem Molekül, aus denen ein Strukturvorschlag für ein TP konstruiert werden kann.

Um die Verlässlichkeit solcher Strukturvorschläge aus Massenspektren zu kategorisieren, bildete Schymanski et al. (2014) ein System mit fünf Konfidenzgraden. Diese Konfidenzgrade richten sich nach der Verlässlichkeit, wie sicher ein Strukturvorschlag einem tatsächlichen TP entspricht. Ist ein Strukturvorschlag durch einen Referenzstandard verifiziert, so liegt der Strukturvorschlag auf dem Konfidenzgrad 1. Kann ein Strukturvorschlag durch ein Referenzspektrum einer Spektrenbibliothek verglichen werden oder kann dargelegt werden, dass keine andere Struktur aus dem Spektrum rekonstruiert werden kann, so wird die Verlässlichkeit als „wahrscheinlich“ eingestuft und entspricht jeweils einem Konfidenzgrad von 2a bzw. 2b. Der Konfidenzgrad 3 umfasst „vermutliche Kandidaten“ für Strukturvorschläge, die nur auf der Interpretation eines Tandem-Massenspektrums (MS^2 -Spektrum) basieren. Da Chromatographie und Massen-

1. Einleitung

spektrometrie die Leitmethoden zur Strukturaufklärung von TPs sind, kommt erschwerend hinzu, dass nicht alle Substanzen gleichermaßen chromatographisch und massenspektrometrisch erfassbar sind. Je nach Molekülgröße und Polarität sind verschiedene stationäre und mobile Phasen sowie verschiedene Ionenquellen unterschiedlich gut geeignet, sodass nicht immer alle TPs einer Substanz entdeckt werden. Wie bereits erläutert, sagt die Umwandlung eines Pharmazeutikums nicht zwingend aus, dass damit dessen Wirkung verloren ist. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass einige TPs ähnlich wie ihre Ausgangssubstanzen wirken. Beispielsweise zeigen photolytisch erzeugte TPs von Anthrazen (Brack et al., 2003) und Naproxen (DellaGreca et al., 2004) eine deutlich stärkere Wirkung auf Organismen als die Substanzen selbst. Für Sulfamethoxazol und anderen Sulfonamid-Antibiotika wurde zwar ein deutlicher Rückgang der antibakteriellen Wirkung gegen *Escherichia coli* nach photolytischem Abbau gezeigt (Wammer et al., 2006), jedoch konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass einige der photolytisch erzeugten TPs das Wachstum von *Aliivibrio fischeri* hemmen (Gmurek et al., 2015). Um das umweltchemische Verhalten von Pharmazeutika vollständig zu erfassen, ist daher neben der Erfassung der Abbaukinetik und der Strukturaufklärung der TPs auch die Beurteilung derer Toxizität erforderlich. Häufig wird die Toxizität mittels eines standardisierten Tests anhand der Biolumineszenzhemmung des Leuchtbakteriums *Aliivibrio fischeri* gemessen. Weiterhin existieren zahlreiche Tests, die auch hormonelle und mutagene Wirkungen an verschiedenen Bakterien und Eukaryoten quantifizieren können.

1.2 β -Lactam-Antibiotika

β -Lactam-Antibiotika waren historisch die ersten Antibiotika, die der Medizin zur Verfügung standen. Obwohl Benzylpenicillin bereits 1928 entdeckt und isoliert wurde, konnte die Substanz erst ab 1941 in ausreichender Quantität und Qualität produziert werden, um in der Medizin eingesetzt zu werden (Goddemeier, 2006). Mittlerweile zählen β -Lactam-Antibiotika zu den wichtigsten Pharmazeutika der Human- und Tiermedizin. Mit mehr als 282 Mio. € Umsatz sind β -Lactam-Antibiotika die wirtschaftlich stärksten Antibiotika, gefolgt von Makrolid-Antibiotika mit 199 Mio. € und Chinolon-Antibiotika mit 162 Mio. € (Stand 2001: Günther et al., 2003). In dieser Studie wurde der photolytische Abbau folgender vier β -Lactam-Antibiotika untersucht:

- Amoxicillin (AMX) Breitspektrumantibiotikum der Aminopenicilline, Zulassung 1981, gegen Grampositive und einige Gramnegative Bakterien wirksam.
- Ampicillin (AMP) Breitspektrumantibiotikum der Aminopenicilline, Zulassung 1961, Anwendung bei Infektionen aller Art, gegen Grampositive Bakterien und Gramnegative Stäbchen wirksam.

1. Einleitung

- Phenoxymethylpenicillin bzw. Penicillin V (PEN) Schmalspektrumantibiotikum der Penicilline, Zulassung: 1952, gegen Streptokokken und Staphylokokken wirksam.
- Piperacillin (PIP) Antibiotikum mit dem breitesten Spektrum aller β -Lactam-Antibiotika, gehört zu den Acylaminopenicillinen und Ureidopenicillinen. Das besonders große Wirkungsspektrum wird dem Ureasubstituenten zugeschrieben, der eine stärkere Bindung zwischen dem β -Lactamring und dem Zielprotein ermöglicht. Acylaminopenicilline sind nicht säurestabil und müssen daher parenteral (z.B. intravenös) verabreicht werden (imedikament.de).

1.2.1 Wirkmechanismus von β -Lactam-Antibiotika

Der viergliedrige β -Lactamring bindet an das Enzym D-Alanin-Transpeptidase, das für die Bildung von Peptidoglycan verantwortlich ist. Dadurch kann die Zellwand der Bakterien nicht erneuert werden und es kommt somit während der Zellteilung zum Aufbrechen der Bakterien. Die Affinität und Penetrationsfähigkeit im menschlichen und tierischen Gewebe wird durch funktionelle Gruppen gesteuert (Holzgrabe, 2006). Fast alle β -Lactam-Antibiotika gehören zu den Breitspektrumantibiotika und wirken bakterizid gegen Grampositive und -negative Bakterien. Abb. 1.2.1 zeigt die Strukturformel von Penicillin V.

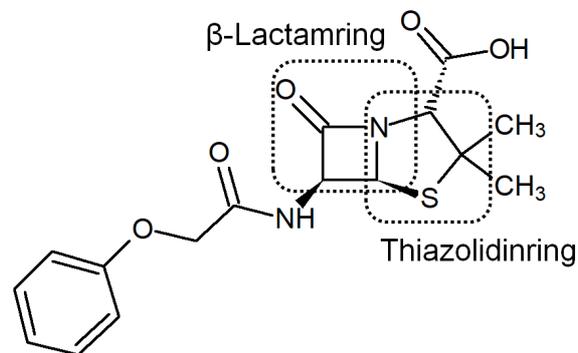


Abb. 1.2.1: Strukturformel von PEN.

β -Lactam-Antibiotika lassen sich in zwei wesentliche Gruppen unterteilen: Pename enthalten neben dem β -Lactamring einen fünfgliedrigen Thiazolidinring. Hierzu gehören viele der gängige β -Lactam-Antibiotika wie AMX, AMP, PEN und PIP. Cephame wie beispielsweise Cephalosporin enthalten einen sechsgliedrigen Thiazinanring statt des Thiazolidinrings. Sowohl Pename als auch Cephame haben ein Schwefelatom in der 1-Position, das durch Sauerstoff oder Kohlenstoff ersetzt werden kann (Oxa- oder Carboverbindungen). Fast alle dieser Kombinationen zeigen eine bakterizide Wirkung (Holzgrabe, 2006). Gegen zellwandlose Bakterien sind alle β -Lactam-Antibiotika unwirksam. Aufgrund des jahrzehntelangen Einsatzes diese Substanz haben sich zahlreiche Resistenzmechanismen gegen β -Lactam-

1. Einleitung

Antibiotika ist die Bildung von β -Lactamasen, die die hydrolytische Öffnung des β -Lactamrings katalysieren (Fisher et al., 2005). Um diesen Resistenzmechanismus zu überwinden, wurden β -Lactamase-resistente β -Lactam-Antibiotika (z.B. Cephalosporine) entwickelt, die sterisch vor β -Lactamasen geschützt sind (Holzgrabe, 2006). Weiterhin können β -Lactamasen durch Tazobactam inaktiviert werden, indem der β -Lactamring von Tazobactam irreversibel an die β -Lactamasen bindet (Yang et al., 1999).

1.2.2 Verbrauch von β -Lactam-Antibiotika

In der Humanmedizin werden β -Lactam-Antibiotika bei mehr als 50% aller Infektionen verordnet (Elander, 2003). In Deutschland werden überwiegend β -Lactam-Antibiotika der Untergruppen der Penicilline, Aminopenicilline und Cephalosporine verordnet.

Auch in der Tiermedizin gehören β -Lactam-Antibiotika mit einem jährlichen Verbrauch von 200 t in Deutschland nach den Tetracyclin-Antibiotika (350 t) zu den mengenmäßig am meisten verwendeten Antibiotika (Küster et al., 2013). In Anbetracht des hohen Konsums sind die Konzentrationen dieser Antibiotika in der aquatischen Umwelt verhältnismäßig gering. Eine Studie des Bund- und Länderausschuss für Chemikaliensicherheit zeigte, dass in mehr als 50% der untersuchten Klärwerksabläufen und Oberflächenwässern keine β -Lactam-Antibiotika nachgewiesen werden konnten. Die höchsten gemessenen Konzentrationen in Klärwerksabläufen lagen bei 147 ng/L für AMX, 23 ng/L für Flucloxacillin, 13 ng/L für PEN und 40 ng/L für PIP (BLAC, 2003). Hieraus lässt sich erkennen, dass ein Teil der β -Lactam-Antibiotika die biologische Abwasserbehandlung unverändert passieren kann.

1.2.3 Verhalten von β -Lactam-Antibiotika in der aquatischen Umwelt

Im Allgemeinen gelten β -Lactam-Antibiotika in der aquatischen Umwelt als eher instabil, da der β -Lactamring in wässriger Matrix zur hydrolytischen Öffnung neigt. AMX beispielsweise hat unter pH-neutralen Bedingungen eine Halbwertszeit von sechs Tagen bei 30°C (Hirte et al., 2016) und PEN von neun Tagen bei 24°C mit steigender Abbaugeschwindigkeit bei höherem pH und höheren Temperaturen (Benedict et al., 1946). Laut Mitchell et al. (2014) führt ein Temperaturanstieg von 10 K zu einer Verdreifachung der Reaktionsgeschwindigkeit bei der hydrolytischen Ringöffnung.

Unter Umweltbedingungen kann Hydrolyse allein den Abbau von β -Lactam-Antibiotika jedoch nicht erklären. Hier sind unter anderem mikrobielle Enzyme wie Laccasen (Becker et al., 2016) und β -Lactamasen (Fisher et al., 2005) wesentlich am Abbau der β -Lactam-Antibiotika beteiligt. Die bei der Ringöffnung entstandene Carbonsäure spaltet sich anschließend vom Molekül ab (Hirte et al., 2016; Längin et al., 2009; Nägele und Moritz, 2005). Die durch diese Reaktionen entstandenen TPs von AMX wurden bisher nicht nur in

1. Einleitung

ungeklärtem und geklärtem Abwasser (Hirte et al., 2016), sondern auch in Oberflächenwasser und Grundwasser gefunden (Gozlan et al., 2010). Der weitere Abbau dieser TPs ist bislang nur wenig untersucht.

1.3 Oxazolidinon-Antibiotika

Ein wesentlicher Ansatz zur Behandlung von Infektionen durch multiresistente Bakterien ist der Einsatz von Reserveantibiotika. Hierzu zählen zum einen neu entwickelte Antibiotika aus bereits etablierten Klassen, die die Resistenzmechanismen gegen ihre unwirksamen Analoga umgehen können, wie beispielsweise Tigecyclin und die Carbapeneme. Zum anderen gehören auch Antibiotika aus komplett neu entwickelten Klassen zu den Reserveantibiotika, wie die Oxazolidinon-Antibiotika.

Ursprünglich wurden Oxazolidinone von dem Chemiekonzern DuPont als Pflanzenschutzmittel entwickelt und 1987 patentiert (Brickner, 1996). Pharmacia und Upjohn (mittlerweile Pfizer) untersuchten in den 90er Jahren die antibakterielle Wirkung dieser Substanzen. Insbesondere Linezolid (LIN) und Eperozolid erwiesen sich als Kandidaten für künftige Antibiotika, wobei LIN eine bessere Wirkung bei geringerer Dosis zeigte (Barbachyn und Ford, 2003). Mit der Zulassung von LIN durch die amerikanische Food and Drug Administration kam erstmalig seit über 30 Jahren eine neue Antibiotikaklasse auf den Markt (Norrby, 2001). In den USA wird LIN als ZyvoxTM und in Europa seit 2001 als ZyvoxidTM vermarktet und als Injektion oder in Tablettenform verabreicht (Pfizer Inc, 2008).

2014 kam Tedizolid (TED) als zweites Oxazolidinon-Antibiotikum auf den Markt (Zhanel et al., 2015). Sowohl in den USA als auch in der EU wird TED unter dem Markennamen SivextroTM ebenfalls in Tablettenform und als Injektion angeboten (Merck Sharp und Dohme Corporation, 2017). TED wird aufgrund seiner geringen Löslichkeit als Tedizolid-phosphat (Prodrug) verabreicht. Im Körper hydrolysiert es dann zum antibakteriellen Wirkstoff enzymatisch durch Phosphatasen (Chen et al., 2016; Kim et al., 2017; Ong et al., 2014; Schaadt et al., 2009). Weitere Oxazolidinon-Antibiotika wie Posizolid (Howe et al., 2003) und Ranbezolid (Kalia et al., 2009) sind bisher nicht zugelassen.

1.3.1 Wirkmechanismus von Oxazolidinon-Antibiotika

Oxazolidinon-Antibiotika sind eine Gruppe heterozyklischer Verbindungen, die einen aliphatischen, cyclischen Esther mit einem Amid beinhalten: den Oxazolidinonring. Einige Oxazolidinone zeigen antibakterielle Eigenschaften, indem Sie an die 23S rRNS der bakteriellen 50S Ribosomen binden, sodass die Bildung des 70S-Initiationskomplexes und damit die Proteinsynthese blockiert wird und der Metabolismus der Zelle zum Erliegen kommt (Zhanel et al., 2015). Abb. 1.3.1a zeigt die Strukturformel von LIN.

1. Einleitung

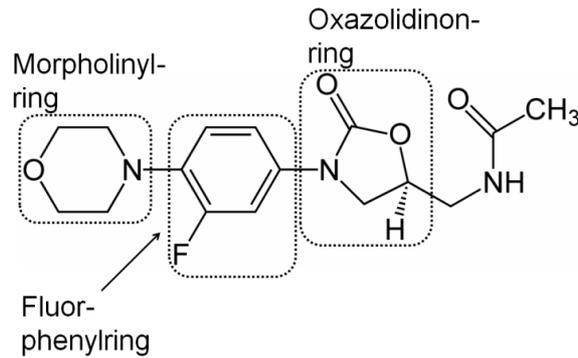


Abb. 1.3.1a: Strukturformel von LIN.

Die Struktur von LIN erlaubt zwei Enantiomere, wobei nur das (5S)-Enantiomer antibakteriell wirksam ist. Die Acetamidgruppe und der Phenylsubstituent am Oxazolidinonring sind ausschlaggebend für die antibakterielle Wirkung der Substanz. Das Fluoratom am Phenylring verstärkt diesen Effekt. Durch den induktiven Effekt des Morpholinylrings wird die Verträglichkeit für Patienten erhöht (Barbachyn und Ford, 2003). LIN wirkt bakteriostatisch gegen Staphylokokken und Enterokokken und bakterizid gegen Pneumokokken (Barbachyn und Ford, 2003). Aufgrund des neuartigen Wirkmechanismus kann LIN auch gegen multiresistente Staphylokokken (MRSA) und gegen vancomycin-resistente Enterokokken erfolgreich eingesetzt werden (Herrmann et al., 2008).

Im Gegensatz zu LIN verfügt TED über einen Pyridinyl- und einen Tetrazolylring, die im Ribosom zusätzlich die Peptidyltransferase blockieren. Damit hat TED eine vier bis achtfach stärkere Wirkung gegen Staphylokokken und Enterokokken als LIN (Bensaci und Sahn, 2017; Locke et al., 2010; Michalska et al., 2013; Schaadt et al., 2009; Shaw und Barbachyn, 2011). Die Wirkungsweise des Fluorphenylrings und des Oxazolidinonrings unterscheiden sich nicht zwischen beiden Antibiotika. Abb. 1.3.1.b zeigt die Strukturformel von TED.

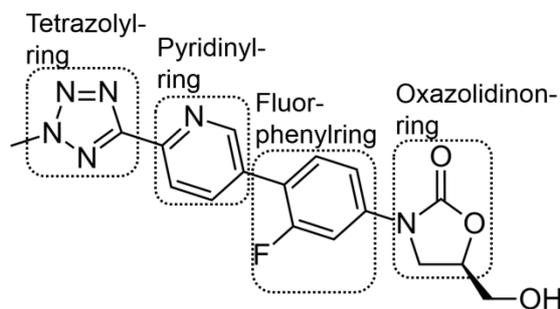


Abb. 1.3.1b: Strukturformel von TED.

Bislang wurde die Entwicklung von oxazolidinon-resistenten Bakterien nur in seltenen Fällen beobachtet (Bi et al., 2018; Mendes et al., 2014b; Shaw und Barbachyn, 2011), überwiegend bei Enterokokken (Bi et al., 2018). In den meisten Fällen zeigen diese Bakterien eine

1. Einleitung

Veränderung der Ribosomstruktur, sodass Oxazolidinon-Antibiotika nicht mehr die Proteinsynthese dieser Bakterien verhindern können (Bi et al., 2018; Mendes et al., 2014a; Shaw und Barbachyn, 2011).

1.3.2 Verhalten von Oxazolidinon-Antibiotika in der aquatischen Umwelt

LIN und insbesondere TED sind im Vergleich zu anderen Antibiotikaklassen erst seit wenigen Jahren zugelassen, weswegen vergleichsweise wenig wissenschaftliche Literatur über diese Substanzen verfügbar ist. Konkrete Daten zum Verbrauch dieser Reserveantibiotika wurden nicht gefunden. Da der Verbrauch an Reserveantibiotika in den letzten Jahrzehnten stetig angestiegen ist (Schröder, 2011), ist auch ein steigender Verbrauch an Oxazolidinon-Antibiotika denkbar.

Sowohl oral als auch intravenös verabreichtes LIN ist nahezu zu 100% bioverfügbar und hat im Körper eine Halbwertszeit von circa 5 h (Stalker et al., 2003), weswegen ungefähr 30% LIN unverändert ausgeschieden wird (Pfizer Inc, 2008; Slatter et al., 2001). Die Bioverfügbarkeit von TED liegt bei 91% nach oraler Einnahme (Kim et al., 2017; Merck Sharp und Dohme Corporation, 2017). Die Halbwertszeit im Körper liegt zwischen 9 und 12 h (Ong et al., 2014; Zhanel et al., 2015). Nur 3% werden unverändert ausgeschieden (Merck Sharp und Dohme Corporation, 2017; Ong et al., 2014). Informationen zu Konzentrationen von Oxazolidinon-Antibiotika in der aquatischen Umwelt sind nicht gefunden worden. In mehreren US-amerikanischen Abwasserproben wurden vor der Klärung zwischen 3 bis 62 µg/L LIN nachgewiesen (Kulkarni et al., 2017), wobei die außergewöhnlich hohen Konzentrationen an LIN und anderen Antibiotika nicht weiter diskutiert wurden. Durch den Vergleich mit den Antibiotikakonzentrationen in deutschen Abwässern ist ein derart hoher Wert in Deutschland unwahrscheinlich. Jedoch liegen bisher keine Informationen zu Konzentrationen von Oxazolidinon-Antibiotika in Europa vor.

Studien zum Abbau von LIN zeigen, dass Photolyse zur Defluorierung führen kann und dass sowohl Photolyse als auch Hydrolyse im sauren und im basischen Milieu zur Öffnung des Morpholinylrings führen kann, während der Oxazolidinonring unverändert bleibt (Fasani et al., 2009; Martin et al., 1999; Tiwari und Bonde, 2012). TED wurde von Lei et al. (2017) als photolytisch stabil bezeichnet, wobei die photolytischen Experimente jedoch in trockener, ungelöster Form stattfanden. Hydrolytischer Abbau in basischer Lösung führte zu einer Öffnung des Oxazolidinonrings, während unter sauren und oxidativen Bedingungen der Pyridinylring zu einem zwitterionischen 1-Hydroxypyrimidinylring oxidiert. Der Tetrazolyling zeigte sich bei allen Abbauprozessen stabil.

1. Einleitung

1.4 Photochemie von Mikroschadstoffen

Photolyse bezeichnet eine chemische Reaktion, bei der eine Substanz durch Strahlung in Form von Licht verändert wird (Schwarzenbach, 2003). Im Alltag lassen sich photolytische Reaktionen beim Ausbleichen farbiger Oberflächen oder bei der Entstehung von Sonnenbrand beobachten, wobei Licht zur Zerstörung von Pigmenten, bzw. zur Schädigung der Haut führt. Ebenso können in Wasser gelöste Substanzen durch Licht umgewandelt werden. Für den photochemischen Abbau von Mikroschadstoffen in Wasser existieren zwei wesentliche Energiequellen.

Ultraviolette (UV) Strahlung wird zur photolytischen Desinfektion in der Trinkwasseraufbereitung verwendet. Dies geschieht in der Regel in Kombination mit Oxidantien wie Ozon oder Wasserstoffperoxid und Photokatalysatoren wie Titandioxid als sogenannte „advanced oxidation processes“ (Munter, 2001; Oppenländer, 2007).

Die zweite wesentliche Energiequelle ist Sonnenlicht. Zahlreiche Studien beschreiben den Abbau verschiedener Pharmazeutika durch Sonnenlicht in der aquatischen Umwelt (Doll und Frimmel, 2004; Gmurek et al., 2015; Kondrakov et al., 2016). Diese beiden Prozesse unterscheiden sich stark in Hinsicht der Strahlungsquelle sowie in den chemischen und physikalischen Eigenschaften des Wassers.

1.4.1 Absorption elektromagnetischer Strahlung

Elektromagnetische Strahlung beruht auf Wellen aus synchron oszillierenden elektrischen oder magnetischen Feldern. Quantenphysikalisch kann elektromagnetische Strahlung auch als Fluss von Photonen betrachtet werden. Die Energie elektromagnetischer Strahlung nimmt mit zunehmender Wellenlänge ab. Das Spektrum elektromagnetischer Strahlung lässt sich in folgende Bereiche einteilen:

1. Einleitung

Tab. 1.4.1: Einteilung des Spektrums elektromagnetischer Wellen und deren Einfluss auf Teilchen (Atkins und de Paula, 2006; Christian, 2004).

Bereich	Wellenlänge	Einfluss auf Quantenteilchen
Gammastrahlung	< 10 pm	Anregung des Atomkerns
Röntgenstrahlung	10 pm – 10 nm	Anregung der inneren Elektronen
Ultraviolettes Licht	10 nm – 380 nm	Anregung von π -Elektronen
Sichtbares Licht	380 nm – 780 nm	Anregung großer konjugierter π -Elektronensysteme und d-Elektronen in Komplexen
Infrarotes Licht	780 nm – 1 mm	Schwingung und Rotation von Atomen und Atomgruppen in einem Molekül
Mikrowellen	1 mm – 30 cm	Rotation, hauptsächlich bei Dipolen und Multipolen
Radiowellen	> 30 cm	-

Trifft elektromagnetische Strahlung auf ein Molekül, so kann die Strahlung absorbiert, reflektiert oder transmittiert werden. Transmission und Reflexion haben keine Auswirkung auf die quantenmechanischen Energiezustände der Elektronen. Nach dem Grotthus-Draper-Gesetz (erster Hauptsatz der Photochemie) gilt für eine photochemische Reaktion die Voraussetzung, dass die Substanz Photonen aus dem Spektralbereich des einstrahlenden Lichts absorbieren kann (Albini, 2016; Salgado et al., 2013). In einigen Fällen kann der pH-Wert für direkte Photolyse relevant sein, sofern sich die Absorptionsspektren verschiedener Spezies einer Substanz unterscheiden (Fatta-Kassinou et al., 2011).

1. Einleitung

1.4.2 Photolytische Anregung und Relaxation der Elektronen

Insbesondere π -Elektronen in Aromaten, Alkenen und Alkinen sowie nichtbindende Elektronenpaare wie in Ketonen, Aldehyden und Aminen absorbieren energiereiche Strahlung UV-Bereich. Bei großen konjugierten Systemen von π -Elektronen verschiebt sich das Absorptionsspektrum in den langwelligeren, sichtbaren Spektralbereich (Atkins und de Paula, 2006). Die Absorption von elektromechanischer Strahlung aus dem UV- und sichtbaren Bereich hebt Elektronen von bindenden (σ oder π) Orbitale in energetisch höhere antibindende (σ^* oder π^*) Orbitale. Aufgrund der starken Extinktion von UV-Licht durch π -Elektronen treten insbesondere $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge sehr häufig auf. Auch Elektronen aus nicht-bindenden Elektronen können durch Licht in $n \rightarrow \pi^*$ -Übergängen auf ein höheres Energieniveau angeregt werden. Durch die Anregung der Elektronen ist das Molekül anschließend in einem deutlich reaktiveren Zustand (Schwarzenbach, 2003).

Fallen die angeregten Elektronen wieder in den Grundzustand zurück, wird die gewonnene Energie wieder abgegeben. Abb. 1.4.2 zeigt die möglichen Prozesse der Relaxation eines Moleküls i:

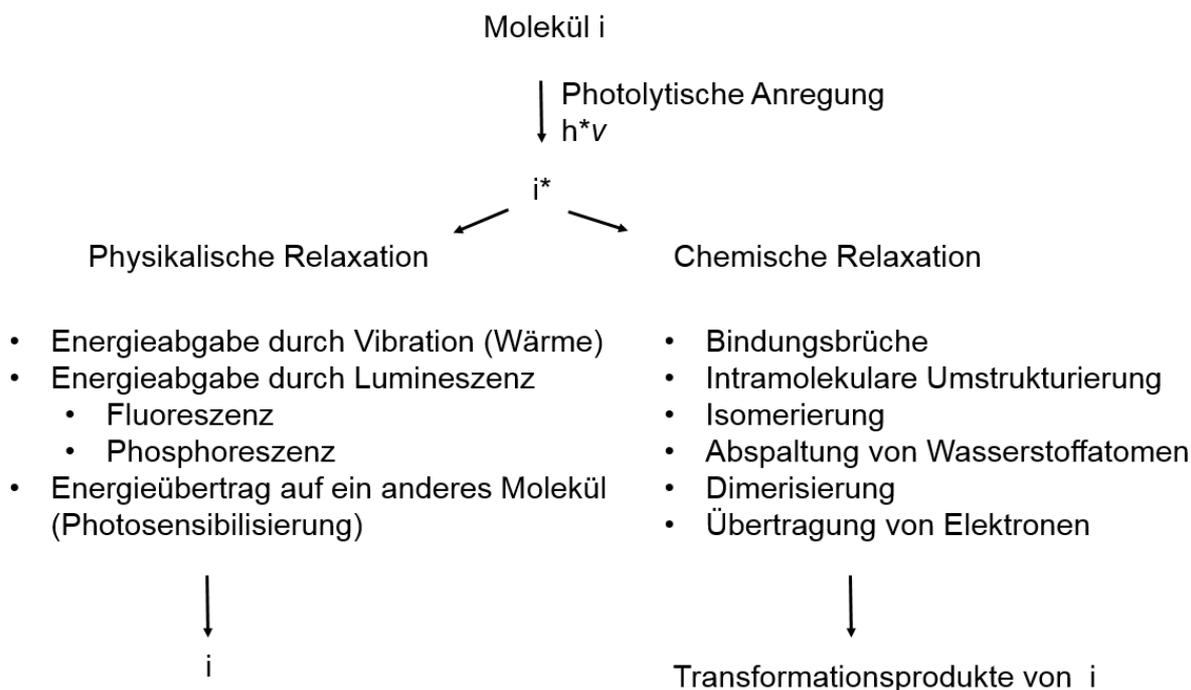


Abb. 1.4.2: Physikalische und chemische Formen der Relaxation von Elektronen (Calvert und Pitts, 1967; Turro, 1991, bearbeitet).

Während die Moleküle nach physikalischen Relaxationsprozessen wieder den ursprünglichen Zustand einnehmen, resultieren chemische Prozesse (direkte Photolyse) in einer Änderung der Struktur oder der Konfiguration des Moleküls.

1. Einleitung

1.4.3 Kinetik photolytischer Reaktionen

Sieht man die Strahlungsintensität als zeitlich konstanten Parameter einer Reaktion an, so hängt die Reaktionsgeschwindigkeit linear mit der Konzentration der abzubauenen Substanz [A] zusammen und nimmt über die Zeit t ab. Damit folgt die Reaktion einer Kinetik pseudoerster Ordnung. Die Reaktionsgeschwindigkeit einer Reaktion erster bzw. pseudoerster Ordnung lässt sich über die Geschwindigkeitskonstante k (F. 1) oder die Halbwertszeit $t_{1/2}$ (F. 2) beschreiben.

$$k = \frac{\ln [A]_0 - \ln [A]}{t} \quad \text{F. 1}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{F. 2}$$

Die Halbwertszeit verhält sich dabei reziprok zur Reaktionsgeschwindigkeit. Eine lange Halbwertszeit entspricht einer langsamen Reaktion und damit einer geringen Reaktionskonstante.

1.4.4 Indirekte Photolyse

Wesentlich komplexer ist die indirekte Photolyse, bei der ein durch Licht angeregtes Molekül die Energie auf ein anderes Molekül überträgt und dieses sich anschließend im angeregten Zustand befindet (siehe Abb. 1.4.2). Dem nun angeregten Molekül stehen ebenso die beschriebenen physikalischen und chemischen Prozesse zur Relaxation offen, wobei nun die chemische Reaktion als indirekte Photolyse bezeichnet wird.

In der aquatischen Umwelt kann gelöster organischer Kohlenstoff (DOC) wie Huminstoffe, Huminsäuren und Fulvinsäuren als Überträger der Energie dienen und somit als sogenannter Photosensibilisierer zur indirekten Photolyse von anderen Substanzen beitragen. Weiterhin können durch die Absorption von Strahlung durch DOC reaktive Sauerstoffspezies in Wasser wie Singulett-Sauerstoff (Boreen et al., 2008; Cory et al., 2009; Grandbois et al., 2008; Haag und Hoigne, 1986; Latch und McNeill, 2006) und hochreaktive Hydroxylradikale (Vaughan und Blough, 1998) entstehen. Diese können zum Abbau von Mikroschadstoffen beitragen, selbst wenn diese kein Licht absorbieren (Bergamini und Silvi, 2016; Fatta-Kassinos et al., 2011; Schwarzenbach et al., 2003).

Eine weitere Form der indirekten Photolyse ist die Photokatalyse, bei der Halbleiter wie Titandioxid UV-Licht absorbieren, wodurch Elektron-Loch-Paare entstehen, die zur Bildung von Hydroxylradikalen führen. Die Wellenlänge der absorbierbaren Strahlung hängt dabei reziprok von der Breite der Bandlücke des Halbleitermaterials ab, sodass Titandioxid Strahlung nur bis 390 nm absorbieren kann (Albini, 2016). Die Verwendbarkeit von Sonnenlicht in Kombination mit Titandioxid als Photokatalysator für den Abbau von

1. Einleitung

Mikroschadstoffen wurde bereits in mehreren Studien beschrieben (Albini, 2016; Doll und Frimmel, 2003; Kondrakov et al., 2016). Mithilfe chemischer Modifikationen können Titandioxid-Nanopartikel auch Strahlung des sichtbaren Lichts absorbieren (Gosh und Das, 2015). Weitere Photokatalysatoren sind Oxide von Vanadium, Chrom, Titan, Zink, Zinn und Cer (Mansoob Khan et al., 2005), wobei diese als Photokatalysatoren aufgrund der geringen Konzentrationen in Ab- und Oberflächenwasser eine untergeordnete Umweltrelevanz haben. Photokatalysierte Reaktionen verlaufen in der Regel deutlich schneller als die direkte Photolyse.

1.4.5 Absorption von Licht in natürlichen Gewässern

Da die Reaktionsgeschwindigkeit einer photolytischen Reaktion linear von der Strahlungsintensität abhängt, nimmt die Geschwindigkeit in trüben oder intransparenten Gewässern mit der Wassertiefe ab. Die Extinktion (Absorbanz eines Materials oder einer Lösung) ist wellenlängenspezifisch und hängt von den gelösten Substanzen, deren Konzentrationen und der Eindringtiefe d ab. Dabei hat jede gelöste Substanz einen Absorptionskoeffizienten ε , der angibt, wie stark eine Substanz Licht einer spezifischen Wellenlänge absorbiert (Lambert et al., 2012). Die Lambert-Beer'sche Gleichung (F.3) beschreibt die Abhängigkeit der Extinktion E von der Konzentration c einer Substanz bei einer spezifischen Wellenlänge λ und der Schichtdicke d :

$$E_{\lambda} = \log_{10} \frac{I_0}{I_1} = \varepsilon_{\lambda} c d \quad \text{F. 3}$$

Weitere Faktoren, die die Lichtintensität in einem Gewässer beeinflussen, sind Reflexion und Lichtbrechung an der Phasengrenzschicht zwischen Wasser und Atmosphäre, sowie Streuung durch kolloidale Partikel (Zafiriou, 1983).

1.5. Sonnenlicht

Sonnenlicht ist die stärkste elektromagnetische Strahlungsquelle in der terrestrischen und aquatischen Umwelt. Zahlreiche Prozesse wie beispielsweise die Bildung der Ozonschicht, die Photosynthese und die Synthese von Vitamin D in der menschlichen Haut verdeutlichen die Notwendigkeit der Sonne für das biologische Leben.

Weiterhin kann Sonnenlicht organische Moleküle wie Pharmazeutika in Wasser abbauen (Bahn Müller et al., 2014; Postigo et al., 2011; Zessel et al., 2014). Auch der Abbau von Antibiotika wie Fluorquinolonen (Prabhakaran et al., 2009) oder Sulfonamiden (Lam et al., 2005, Gmurek et al., 2015) durch Sonnenlicht konnte bereits beobachtet werden.

1. Einleitung

1.5.1 Spektrum des Sonnenlichts

Das solare Spektrum, das die Atmosphäre durchdringt, beginnt bei 300 nm und hat ein Intensitätsmaximum bei circa 500 nm. Ein vernachlässigbar kleiner Anteil des Sonnenlichts kann jedoch auch zwischen 0,1 und 300 nm nachgewiesen werden (nasa.gov). Abb. 1.5.1 zeigt das Spektrum des Sonnenlichts außerhalb der Atmosphäre und auf der Erdoberfläche.

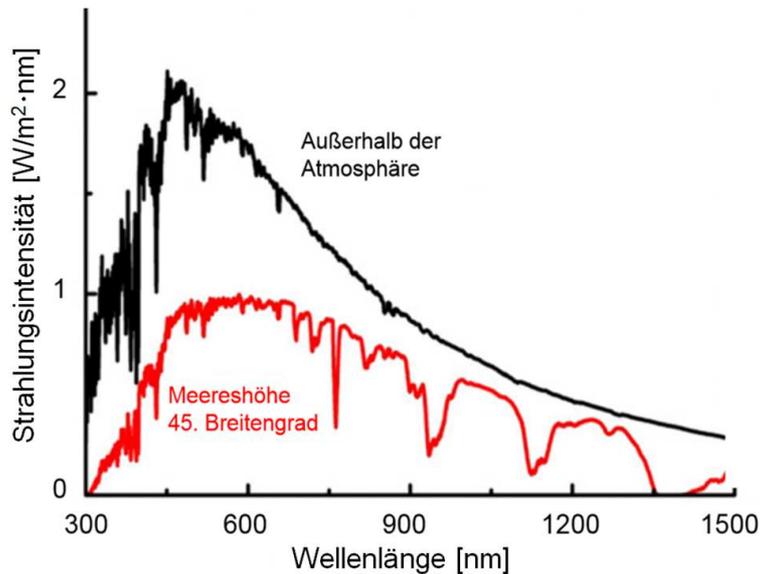


Abb. 1.5.1: Spektrum des Sonnenlichts (Mangold et al., 2013, bearbeitet).

Der Unterschied zwischen dem Spektrum außerhalb der Atmosphäre und dem Spektrum auf der Erdoberfläche lässt sich durch die Strahlungsabsorption von UV-Licht durch die Ozonschicht und durch Treibhausgase wie Kohlenstoffdioxid und Methan erklären.

1.5.2 Strahlungsintensität des Sonnenlichts

Die Strahlungsintensität von Sonnenlicht auf der Erdoberfläche variiert stark in Abhängigkeit des Strahlungswinkels, der sich je nach Tages- und Jahreszeit verändert. Außerhalb der Atmosphäre beträgt die Strahlungsintensität der Sonne 1.367 W/m^2 , wovon aufgrund des geneigten Strahlungswinkels und der Absorption von UV-Licht in der Ozonschicht 1.000 W/m^2 die Erdoberfläche in Mitteleuropa mittags an unbewölkten Sommertagen erreichen (Myers et al., 2000).

Im Winter liegt die Leistung bedingt durch den flacheren Eintragswinkel zwischen 300 und 500 W/m^2 . In Äquatorialregionen bleibt der Sonnenstand in allen Jahreszeiten konstant und erreicht mittags einen Winkel von 90° über dem Horizont (Zenit), sodass dort die Strahlungsintensität am stärksten ist.

Weiterhin hängt die Intensität der Sonnenstrahlung von Wetter und Klima ab. Bei starker Bewölkung nimmt die Intensität der Sonnenstrahlung auf $50\text{-}150 \text{ W/m}^2$ ab. In Deutschland

1. Einleitung

beträgt die mittlere Sonnenscheindauer 1550 ± 250 h/a (Deutscher Wetterdienst). Abb. 1.5.2 zeigt die jährliche solare Energiezufuhr und die mittlere Sonnenscheindauer in Deutschland.

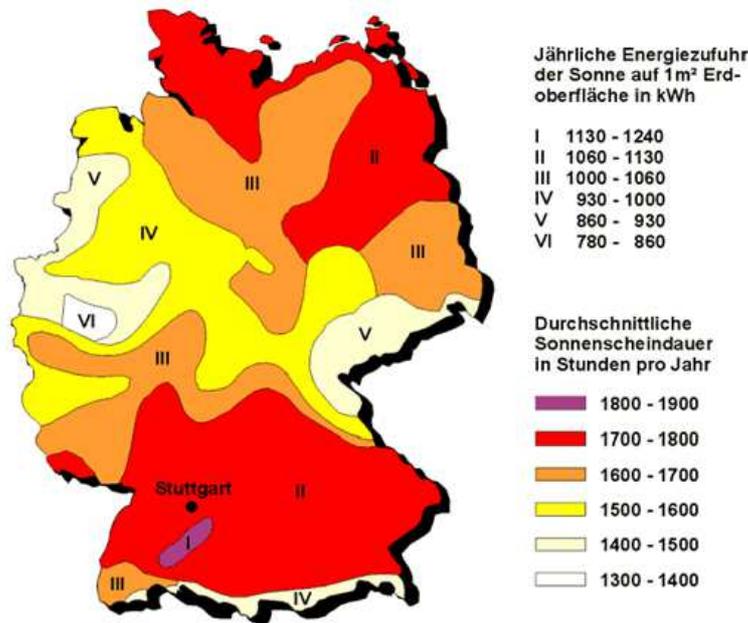


Abb. 1.5.2: Durchschnittliche Sonnenintensität in Deutschland (städtebauliche Klimafibel).

Die Karte zeigt, dass südlich von Stuttgart die höchste jährliche Energiezufuhr durch Sonnenlicht mit Werten bis zu 1.240 kWh/m^2 bei 1.900 Sonnenscheinstunden gemessen wird. Insbesondere der Süden und der Nordosten Deutschlands weisen eine höhere solare Energiezufuhr auf als der Nordwesten. Im nördlichen Rheinland liegt die jährliche Energiezufuhr bei $780\text{-}860 \text{ kWh/m}^2$ am deutschen Minimum.

1.5.3 Photochemische Reaktionen durch Sonnenlicht

Die Photolyse durch Sonnenlicht in der aquatischen Umwelt ist in vielen Hinsichten sehr komplex. Die Abbaukinetiken sind durch direkte und indirekte Photolyse mittels DOC sowie photokatalytisch durch Metallionen gesteuert und werden weiterhin auch durch mikrobiellen und hydrolytischen Abbau ergänzt. Auch Parameter wie pH-Wert und Temperatur haben eine Rolle auf die Abbaukinetik in Oberflächenwasser. Weiterhin wirken je nach Wassertiefe Absorption und Lichtstreuung durch Partikel auf die vorhandene Intensität des Sonnenlichts (Schwarzenbach, 2003). Xu et al. (2011) zeigten am Beispiel von AMX, dass DOC eine wichtige Rolle beim photosensiblen Abbau von Mikroschadstoffen hat. Zum einen absorbiert DOC einen Großteil der ultravioletten und teilweise der sichtbaren Strahlung, sodass weniger Photonen von Mikroschadstoffen absorbiert werden. Andererseits zeigen viele Studien, dass verschiedene organische Moleküle als Photosensibilisierer dienen können, indem sie die

1. Einleitung

absorbierte Strahlung an Mikroschadstoffe übertragen können und damit den indirekten photolytischen Abbau vermitteln.

1.6 Ziel der Forschung

In dieser Studie soll untersucht werden, ob Sonnenlicht in der Lage ist, Antibiotika in der aquatischen Umwelt abzubauen. Hierzu wird zunächst die photolytische Abbaukinetik mit simuliertem Sonnenlicht in Reinstwasser und in natürlichem Oberflächenwasser untersucht, um Rückschlüsse über die Photostabilität zu ziehen. Weiterhin ist geplant, die photolytisch entstandenen TPs zu ermitteln um damit die Reaktionswege zu rekonstruieren. Dadurch kann gezeigt werden, inwiefern sich Photolyse hinsichtlich der TPs von Hydrolyse und mikrobiellem Abbau unterscheidet. Weiterhin können über die chemischen Strukturen der TPs Rückschlüsse über deren antibakterielle Wirkung gezogen werden.

Im letzten Schritt soll die Wirkung der photolytisch abgebauten Antibiotika an zwei verschiedenen Bakterien untersucht werden. Zum einen wird die Wachstumshemmung an *Bacillus subtilis* gemessen, zum anderen wird die Hemmung der Biolumineszenz von *Aliivibrio fischeri* in einem DIN-standardisierten Test gemessen.

Für dieses Projekt wurden zwei Antibiotikaklassen gewählt: β -Lactam-Antibiotika und Oxazolidinon-Antibiotika. Damit ist eine Klasse langjährig verwendeter Antibiotika mit häufiger Anwendung und eine neu entwickelte Klasse von Reserveantibiotika vertreten.

2. Material und Methoden

Mit Ausnahme der hochauflösenden Massenspektren und der Toxizitätstests an *Aliivibrio fischeri* wurden alle Experimente und Messungen am Engler-Bunte-Institut des Karlsruher Instituts für Technologie durchgeführt.

2.1 Chemikalien

Tab. 2.1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.

Substanz	Reinheitsgrad	Hersteller
Amoxicillin-Trihydrat	p.a.	Sigma-Aldrich (Deutschland)
Ampicillin		
Piperacillin-Natrium		
Penicillin V Kalium		
Penicilloinsäure		
Natronlauge		
Penicillin-D5	p.a.	Toronto Research Chemicals (Kanada)
Linezolid		
Linezolid-D3		
Tedizolid		
Tedizolid-D3		
1-Ethylpiperazin-2,3-dion	>99%	IOC, KIT*
2-[[2-amino(phenyl)acetamido]methyl]-5,5-dimethyl-1,3-thiazolidin-4-carbonsäure	>99%	ChiroBlock (Deutschland)
Ameisensäure 98-100%	p.a.	Merck KGaA (Deutschland)
Ammoniak 25%		
Dimethylsulfoxid	p.a.	VWR-International (USA)
Salzsäure		
Acetonitril	LC-MS	VWR-International (USA)
Methanol		
Reinstwasser		
Hefeextrakt	-	Acrös Organics (Belgien)
Natriumchlorid	>99,8%	Roth (Germany)

2. Material und Methoden

* 1-Ethylpiperazin-2,3-dion wurde von Danny Wagner (Institut für organische Chemie, KIT) durch die Reaktion von Oxalsäure-diethylether mit N-ethyl-ethylen-diamin in Ethanol bei Raumtemperatur dargestellt (Togana Chemical Co. hdt, patent US 4087424A1, 1978) und in Dimethylsulfoxid gelöst.

Stammlösungen aller β -Lactam-Antibiotika und Penicilloinsäure wurden vor den jeweiligen Experimenten und Messungen in Reinstwasser angesetzt. Stammlösungen von LIN und TED wurden in Acetonitril angesetzt und 2-[[2-amino(phenyl)-acetamido]methyl]-5,5-dimethyl-1,3-thiazolidin-4-carbonsäure in salzsaurem Methanol. Alle Stammlösungen mit organischen Lösemitteln wurden bei -20°C aufbewahrt. PEN-D5 ist am Phenylring deuteriert, LIN-D3 am Methyl-acetamid-substituenten und TED-D3 am Methyltetrazolyling.

2.2. Quantifizierung der Antibiotika

Für die Quantifizierung der Antibiotika wurden zwei verschiedene analytische Methoden entwickelt: Methode A für β -Lactam-Antibiotika und Methode B für Oxazolidinon-Antibiotika. Für beide Methoden wurde ein Agilent 1290 Infinity II UHPLC System mit einer Agilent ZORBAX Eclipse Plus C-18 Säule ($50 \times 2.1 \text{ mm}$, $1,8 \mu\text{m}$ Partikelgröße) zur chromatographischen Trennung verwendet. Die Flussrate der mobilen Phase betrug $0,4 \text{ ml/min}$. Für Methode A wurde eine Gradientenelution mit leicht basischem Wasser ($20 \mu\text{L/L}$ Ammoniak) und Acetonitril mit $0,05\%$ Ameisensäure verwendet und für Methode B wurde Methanol mit $0,05\%$ Ameisensäure statt Acetonitril als organischer Eluent verwendet.

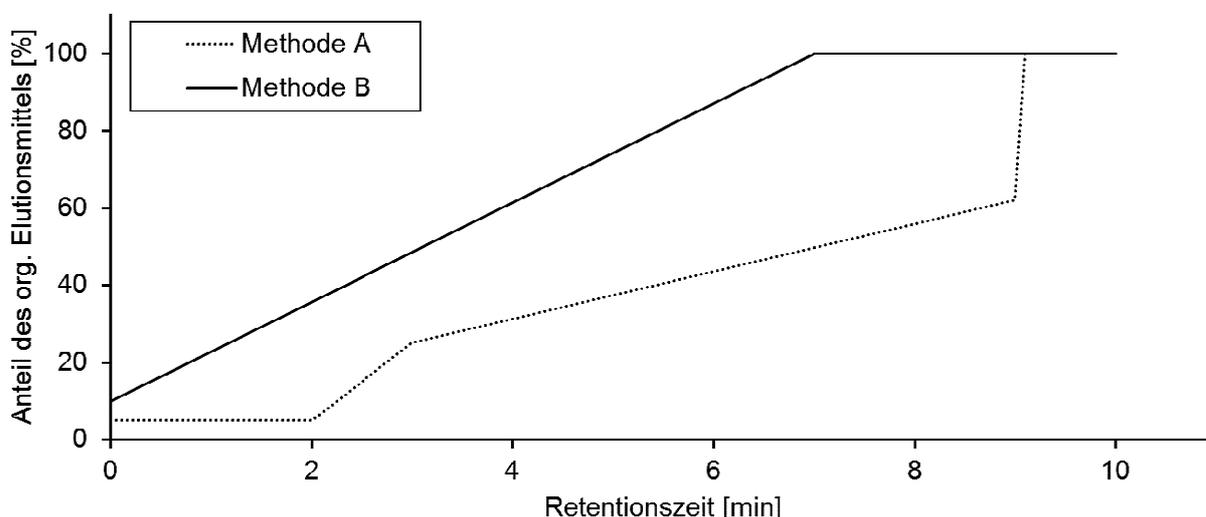


Abb. 2.2a: Anteil des organischen Eluenten der chromatographischen Methoden A und B.

Die Gradienten wurden so eingerichtet, dass die Analyten eine deutliche chromatographische Trennung bei adäquater Peakschärfe und kurzer Messdauer aufzeigen. Die Detektion von positiven und negativen Ionen erfolgte durch ein Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS System mit einer Agilent Jet Stream Electrospray-Ionenquelle im

2. Material und Methoden

„dynamic multiple-reaction-monitoring mode“. Das bedeutet, dass jeder Analyt nur innerhalb des bestimmten Zeitfensters gemessen wird, wobei sich diese Zeitfenster überlappen können. Tab. 2.2 zeigt die Massenübergänge, die zur Quantifizierung der Analyten gewählt wurden und Abb. 2.2b zeigt ein Chromatogramm mit je 100 ng/L der vier β -Lactam-Antibiotika.

Tab. 2.2: MS²-Massenübergänge der Analyten.

Analyt	Polarität	Precursor [m/z]	Fragment [m/z]
AMX	Negativ	364,1	319,9
			222,9
			206,4
AMP	Negativ	348,1	304,1
			206,9
			74,0
PEN	Negativ	349,1	207,9
			113,9
			92,2
PIP	Positiv	518,2	159,9
			142,2
			114,9
PEN TP1	Positiv	369,1	159,9
			114,0
PIP TP4	Positiv	143,1	114,0
LIN	Positiv	338,2	296,1
			195,0
			56,1
TED	Positiv	371,1	343,1
			228,0
			219,9

2. Material und Methoden

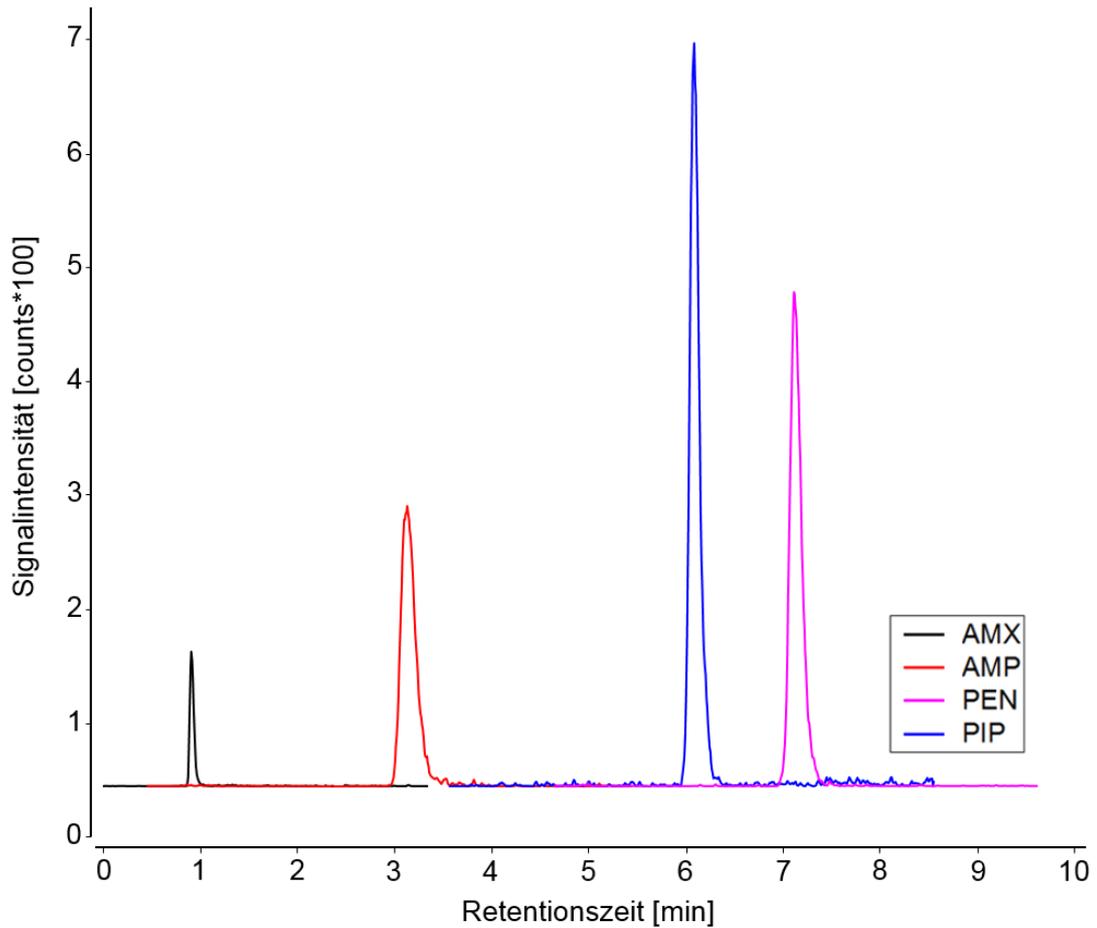


Abb. 2.2b: Chromatogramm mit 100 ng/L von vier β -Lactam-Antibiotika.

Abb. 2.2.b zeigt, dass sich alle vier β -Lactam-Antibiotika chromatographisch deutlich voneinander trennen ließen und innerhalb von acht Minuten eluieren. Die LODs in Reinstwasser lagen bei 5 ng/L für AMX, 1 ng/L für AMP und PIP sowie 2 ng/L für PEN. Eine detaillierte Beschreibung zur Quantifizierung der β -Lactam-Antibiotika wurde als Application Note (Timm et al., 2017) zusammengefasst. Im Rahmen der Methodenentwicklung zeigte sich, dass alle vier β -Lactam-Antibiotika und beide Oxazolidinon-Antibiotika bei Verwendung von neutralem oder leicht basischem Wasser eine deutlich bessere Signalintensität aufzeigen, während der saure organische Eluent für die chromatographische Trennung notwendig ist. Für Methode B wurde saures Methanol mit 0,05% Ameisensäure statt saures Acetonitril verwendet. Abb. 2.2c zeigt ein Chromatogramm mit je 100 ng/L LIN und TED.

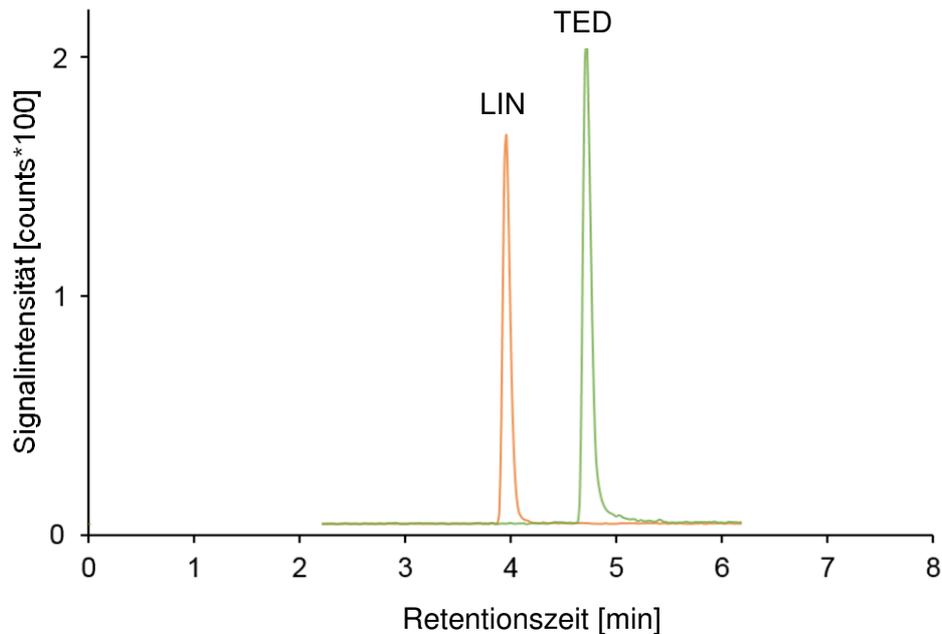


Abb. 2.2c: Chromatogramm mit 100 ng/L von LIN und TED.

Die LODs der Oxazolidinon-Antibiotika in Reinstwasser lagen mit dieser Methode bei 7 ng/L für LIN und 14 ng/L für TED.

2.3 Bestrahlungsexperimente

Da die Strahlungsintensität von natürlichem Sonnenlicht durch den sich jahreszeitlich ändernden Sonnenstand und durch Bewölkung stark variiert, wurde für die photolytischen Experimente simuliertes Sonnenlicht verwendet, da dies eine konstante Strahlungsintensität gewährleistet. Zusätzlich wurden einige Experimente mit einer UV₂₅₄-Strahlungsquelle durchgeführt.

2.3.1 Experimente mit simuliertem Sonnenlicht

Als Strahlungsquelle für das simulierte Sonnenlicht wurde ein Newport 3A Solar Simulator mit einer 1 kW Osram XBO Xenon Birne verwendet. Durch den integrierten Airmass 1,4 G Spektralfilter erzeugt der Sonnenlichtsimulator ein dem Sonnenlicht ähnliches Lichtspektrum mit Wellenlängen zwischen 300 und 1400 nm. Die Lichtintensität wurde auf 1 kW/m² eingestellt, um die Strahlungsintensität einer sommerlichen Mittagssonne in Mitteleuropa zu imitieren (Myers et al., 2000). Die zu bestrahlenden Antibiotikallösungen wurden in herkömmliche Bechergläser mit einem Volumen von 50 ml gefüllt und in die Probenhalterung des Sonnenlichtsimulators gesetzt. Über ein integriertes Kühlsystem wurden die Antibiotikallösungen während der Experimente auf 19° C gekühlt und mit einem Magnetrührer wurde für eine fortlaufende Durchmischung der Lösungen im Sonnenlichtsimulator gesorgt.

2. Material und Methoden

Abb. 2.3.1a zeigt den Aufbau des verwendeten Sonnenlichtsimulators und Abb. 2.3.1b dessen Spektrum.

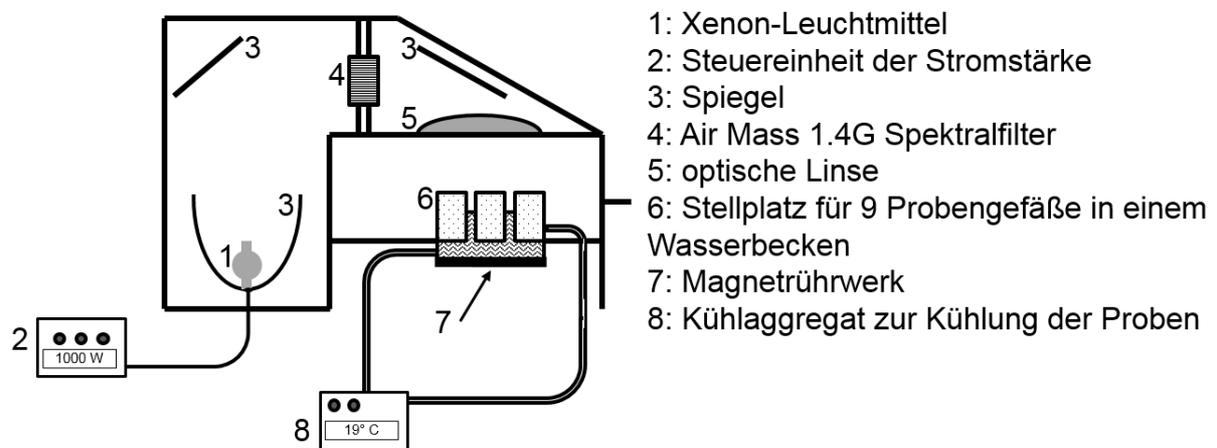


Abb. 2.3.1a: Schematische Zeichnung des Sonnenlichtsimulators.

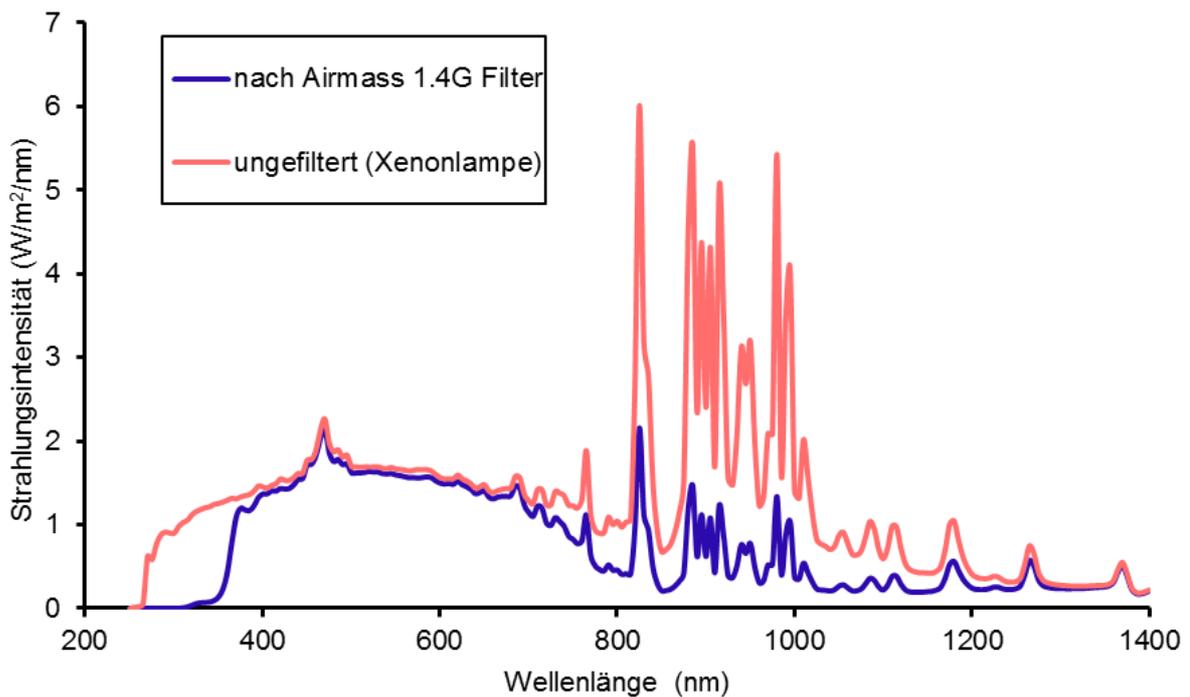


Abb. 2.3.1b: Emissionsspektrum des Newport 3A Sonnenlichtsimulators.

Bei den Probenahmen wurde jeweils 1 ml von den bestrahlten Antibiotikallösungen entnommen und in einem braunen HPLC-Vial bei 4°C bis zur Messung gelagert. Bei Experimenten mit Oberflächenwasser wurden die Proben nach der Probenahme mit einem Spritzenfilter (Chromafil CA-20/25 Zelluloseacetat, 0,2 μm) filtriert, um Bakterien aus den Proben zu entfernen und somit einen weiteren mikrobiellen Abbau nach der Probenahme zu verhindern.

2.3.2 Experimente mit UV₂₅₄-Licht

Für die Experimente mit UV₂₅₄-Licht wurde ein Applied Photolytics LTC Karussellreaktor mit einer Niederdruck-Quecksilberlampe verwendet. 12 Quarzreagenzgläser wurden mit je 10 ml Antibiotikallösung befüllt und in den inneren Ring des Reaktors gesetzt. Die berechnete Strahlungsintensität im inneren Ring beträgt circa 700 W/m². Während der Bestrahlung wurden die Reagenzgläser kreisförmig um die Lampe gedreht, um räumliche Strahlungsunterschiede auszugleichen.

2.4 Kinetische Untersuchungen

Zur Bestimmung der photolytischen Reaktionskonstanten wurden die Antibiotikallösungen mit je 1 µg/L Antibiotikum im Sonnenlichtsimulator bestrahlt. Hierzu wurden Mischungen mit allen vier β-Lactam-Antibiotika, beziehungsweise beiden Oxazolidinon-Antibiotika verwendet. Die Kinetik wurde sowohl in Reinstwasser als auch in je zwei Oberflächenwässern der Flüsse Rhein und Alb (beide in Karlsruhe) bestimmt. Beide Flüsse haben Zufluss von geklärtem Abwasser. Zur Charakterisierung der Oberflächenwässer wurde der Gesamtkohlenstoff (TOC) mit einem Shimadzu TOC-L_{CPH} Analyzer quantifiziert. Trübung wurde mit einem Hach Ratio/XR 43900/XR Trübungsmesser bestimmt. Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB), Nitrat, Ammonium und Phosphat wurden über Küvettenschnelltests mit einem Hach Lange DR 3900 Photospektrometer quantifiziert.

Zeitgleich zur Bestrahlung der Lösungen wurden bei jedem Experiment jeweils zwei Bechergläser mit Antibiotikallösungen gefüllt, mit Aluminiumfolie bedeckt und im Sonnenlichtsimulator zu den anderen Lösungen gesetzt, um die Stabilität der Analyten ohne Bestrahlung (Dunkelkontrolle) zu bestimmen. Die Reaktionskonstanten pseudoerster Ordnung und die Halbwertzeiten des Abbaus der Antibiotika wurde mit den Formeln F. 1 und F. 2 (Seite 19-20) bestimmt. Die Reaktionskonstanten für die Bildung und den Abbau der TPs wurde mit F. 4 berechnet:

$$\frac{d c_{TP}}{d t} = k_{\text{Bildung}} c_{AB} - k_{\text{Abbau}} c_{TP} \quad \text{F. 4}$$

k_{Bildung} entspricht der durch F. 1 berechneten Reaktionskonstante k und k_{Abbau} beschreibt den Abbau der TPs. c_{AB} ist die Konzentration des jeweiligen Antibiotikums und c_{TP} die des TP. Um die Absorbanz der Antibiotika zu bestimmen, wurden zusätzlich UV/Vis Spektren der Antibiotikallösungen mit einem Perkin Elmer Lambda XLS Photospektrometer aufgenommen.

2.5 Strukturaufklärung der Transformationsprodukte

Für die Strukturaufklärung der TPs wurden Lösungen mit je eines 500 µg/L β-Lactam-Antibiotikums, bzw. 5 mg/L eines Oxazolidinon-Antibiotikums mit simuliertem Sonnenlicht, bzw. mit UV₂₅₄-Licht bis zum Abbau von 50, 80 und 95% der Antibiotika bestrahlt. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass die TPs eine ausreichende Signalintensität in der Analyse mittels hochauflösender Massenspektrometrie ergeben. Im ersten Schritt wurden die β-Lactam-Antibiotikallösungen vor und nach der Bestrahlung mit einem hochauflösenden Agilent 6550 QToF LC/MS (Quadrupole mit Time-of-Flight-MS, Auflösung: 25.000 bei m/z 622) im Scan-mode gemessen. Für die Untersuchung der Abbauprozesse der Oxazolidinon-Antibiotika wurde ein Agilent 6545 Q-TOF LC/MS verwendet. Die chromatographischen und massenspektrometrischen Einstellungen wurden jeweils von den quantitativen Analysemethoden A und B übernommen. Die Suche nach TPs in den Chromatogrammen gliederte sich in Suspect-, Target- und Non-target Screening.

Beim Target-Screening wurden nach Massen von bereits bekannten TPs gesucht. Insbesondere wurden die Chromatogramme nach Massen von TPs untersucht, die von Fasani et al. (2009), Fatta-Kassinos et al. (2011), Hirte et al. (2016), Junza et al., (2014), Längin et al. (2009), Li et al. (2008), Nägele und Moritz (2005) sowie von Tiwari und Bonde (2012) beschrieben wurden. Für das Suspect-Screening wurde nach berechneten Massen von möglichen TPs gesucht, die durch mögliche Reaktionen wie Hydrolyse, Oxidation oder Bindungsbrüche sowie aus Kombinationen mehrerer Reaktionen entstehen können. Dabei wird die Masse eines potentiellen TP über die Summenformel berechnet und anschließend überprüft, ob das dazugehörige m/z-Signal detektiert wurde. Tab. 2.5 fasst eine Auswahl an Massenänderungen möglicher Reaktionen zusammen.

Tab. 2.5: Typische für das Suspect-Screening berechnete Massenänderungen.

Reaktion	Änderung der Summenformel	Massenänderung [Δ m/z]
Einfache Oxidation	+O	+15,9949
Zweifache Oxidation	+O ₂	+31,9898
Hydrolyse	+H ₂ O	+18,0104
Defluorierung	-F	-18,9984
Decarbonylierung	-CO	-27,9949
Decarboxylierung	-CO ₂	-43,9898
Bindungsbruch	Je nach Bindung	Je nach Bindung

Ausgehend von der molekularen Masse der Antibiotika und von bereits bekannten TPs wurden die Massen weiterer möglicher TPs berechnet und mit den MS²-Spektren verglichen. Je nach Substanz wurden weitere mögliche Reaktionen berechnet.

2. Material und Methoden

Beim Non-Target wurden alle m/z-Signale notiert, die nach der Bestrahlung in den Chromatogrammen auftraten und somit TPs der Antibiotika oder von Fremdstoffen sein können. Um TPs von Antibiotika und Fremdstoffen zu unterscheiden, wurde zusätzlich Wasser ohne Antibiotika bestrahlt und auf TPs hin untersucht.

Durch das Screening wurde zu jedem Antibiotikum eine Liste mit den Massen von möglichen TPs erstellt. Im letzten Schritt wurde zu jeder Masse eines vermeintlichen TP ein MS²-Spektrum aufgenommen. Die Kollisionsenergie zur Fragmentierung der β -Lactam-Antibiotika und derer TPs betrug 10 V. Zur Fragmentierung der Oxazolidinon-Antibiotika und derer TPs wurden 10, 20 und 40 V verwendet und die MS²-Spektren wurden jeweils mit allen drei Kollisionsenergien gemittelt. Über die exakte Masse der Fragmente wurde die jeweilige Summenformel berechnet und über die Summenformel der Fragmente konnten anschließend die Strukturformeln der TPs rekonstruiert werden.

Zusätzlich wurden auch MS²-Spektren der TPs der deuterierten Substanzen PEN-D5, LIN-D3 und TED-D3 aufgenommen, um die Position einzelner Fragmente in dem Molekül mit höherer Verlässlichkeit bestimmen zu können. Dadurch ergibt sich eine höhere Konfidenz für die Strukturvorschläge der TPs.

2.6 Toxizitätstests

Toxizität beschreibt im Allgemeinen eine Stoffeigenschaft, die kurzfristig (akut) oder langfristig (chronisch) eine schädliche Wirkung auf einen Organismus hat und gegebenenfalls zu dessen Tod führen kann. In dieser Studie wurde die akute Toxizität der Antibiotika und derer TPs mittels zwei verschiedener Tests an Bakterien gemessen. Die Toxizität der Antibiotikallösungen wurde vor und nach der zweifachen, vierfachen und sechsfachen Halbwertszeit unter UV₂₅₄-Licht bestimmt. Für die Toxizitätstests wurden sterile Reinstwasserlösungen mit je 10 mg/L AMX, AMP und PEN sowie je 50 mg/L PIP, LIN und TED mit UV₂₅₄-Licht bestrahlt, da die notwendige Bestrahlungsdauer unter simuliertem Sonnenlicht die Lebensdauer des Leuchtmittels von 1000 h deutlich überschritten hätte. Die jeweiligen Antibiotikakonzentrationen vor der Bestrahlung resultieren aus vorherigen Tests, in denen die MHKs in Hemmhoftests bestimmt wurden.

2.6.1 Messung der Wachstumshemmung an *Bacillus subtilis*

Dieser Test misst die Hemmung des Wachstums von *Bacillus subtilis*, um die nach der Bestrahlung verbleibende antibakterielle Aktivität der Antibiotika an einem umweltrelevanten Bakterium zu quantifizieren. *Bacillus subtilis* ist ein Gram-positives aerobes Stäbchenbakterium. Es kommt ubiquitär in Flüssen, Seen und Komposterde vor (Madigan et al., 2012; Mitchell und Gu, 2010; Wiley et al., 2009). Für diese Testreihe wurde der Bakterienstamm DMZ 10 verwendet.

2. Material und Methoden

Vor und nach der Bestrahlung wurden 100 µl der Proben zu 100 µL doppelkonzentrierter Nährlösung mit Bakterien in Mikrotiterplatten (Nunclon Delta Surface, Thermo Scientific) gegeben und 8 h bei 30°C inkubiert. Die Inkubationszeit von 8 h wurde gewählt, da eine kürzere Inkubation kein entsprechendes Wachstum der Bakterien ermöglicht und bei einer längeren Inkubation die Streuung der Daten stark zunahm. Die Wachstumshemmung wurde über die optische Dichte bei 600 nm mit einem Victor3 Wallac 1420 Microtiterplattenleser gemessen und über lineare Regression zwischen den Blindproben mit Bakterien (0% Wachstumshemmung) und ohne Bakterien (100% Wachstumshemmung) berechnet. Für die Blindproben wurde die Nährlösung mit 100 µl steriles Reinstwasser statt Antibiotikallösung versetzt. Die sigmoidale Dosis-Wirkung-Beziehung ergab sich über eine Verdünnungsreihe mit je 2, 4, 8, 16, 32, und 64-facher Verdünnung der Antibiotika mit Reinstwasser. Die Messreihen wurden jeweils als Triplikat in den Mikrotiterplatten angesetzt. Die Nährlösung (Luria broth medium) wurde mit 20 g/L Kasein, 10 g/L Hefeextrakt und 20 g/L Natriumchlorid angesetzt. Der pH von 7 wurde mit Natronlauge eingestellt. Um Einflüsse anderer Mikroorganismen zu vermeiden, wurde das Experiment unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle Utensilien wurden daher mit einem Systec VE-95 Autoklaven sterilisiert.

2.6.2 Messung der Biolumineszenzhemmung von *Aliivibrio fischeri*

Aliivibrio fischeri (früher: *Vibrio fischeri*) ist ein Gram-negatives marines Bakterium, das aufgrund seiner Biolumineszenz in Symbiose mit einigen Tiefseeorganismen wie Tintenfischen lebt (Madigan et al., 2012; Mitchell und Gu, 2010; Wiley et al., 2009). Wegen der biolumineszenten Eigenschaft bietet sich dieser Organismus für schnelle und einfache Toxizitätsmessungen an. Vorteil dieses Tests ist, dass es eine standardisierte Methode zur Bestimmung der akuten Toxizität von Wasserproben ist (ISO 11348-3:2007), die regelmäßig in umweltchemischen Studien zum Einsatz kommt und somit die Vergleichbarkeit verschiedener Studien vereinfacht. Im Gegensatz zum Wachstumshemmtest zeigt dieser Test die toxische Wirkung einer Wasserprobe auf den bakteriellen Metabolismus, selbst wenn dies nicht bakteriostatische oder bakterizide Folgen hat. Damit bietet dieser Test eine optimale Ergänzung zum zuvor beschriebenen Wachstumshemmtest. Nachteil dieses Tests ist, dass *Aliivibrio fischeri* ein mariner Organismus ist und somit eine deutliche Diskrepanz zwischen Mess- und Umweltbedingungen vorliegt. Für diesen Toxizitätstest wurde das Hach-Lange LCK 482 Kit verwendet.

3. Kinetik der Photolyse von Antibiotika unter simuliertem Sonnenlicht

Um den Einfluss von Sonnenlicht auf den Abbau von Antibiotika zu untersuchen, wurde zunächst geklärt, ob β -Lactam- und Oxazolidinon-Antibiotika durch Sonnenlicht abgebaut werden können. Wie in 1.4 behandelt, ist der direkte photolytische Abbau einer Substanz nur möglich, wenn diese Licht aus dem einstrahlenden Spektralbereich absorbieren kann (Salgado et al., 2013). Daher wurden zunächst UV/Vis-Spektren der Antibiotika aufgenommen, um zu bestimmen, ob eine Absorption von Sonnenlicht möglich ist. Abb. 3a zeigt die Absorptionsspektren der β -Lactam-Antibiotika. Diese sowie die nachfolgenden Ergebnisse zur Photolyse von β -Lactam-Antibiotika hinsichtlich der Abbaukinetik, TP's und Toxizität wurden in ähnlicher Form bereits im Rahmen dieser Dissertation publiziert (Timm et al., 2019).

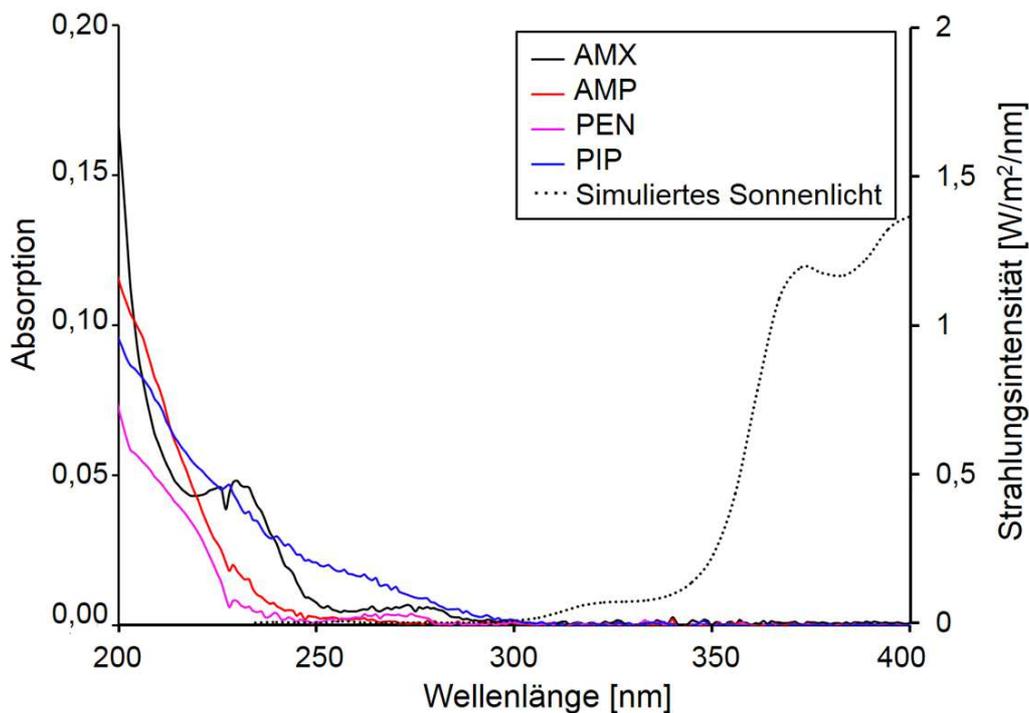


Abb. 3a: UV/Vis-Spektren der vier β -Lactam-Antibiotika, 2 mg/L.

Die UV/Vis-Spektren zeigen, dass die vier β -Lactam-Antibiotika Strahlung im UV-Bereich bis circa 300 nm absorbieren. Alle vier β -Lactam-Antibiotika zeigen einen starken Anstieg der Absorption von UV-C Strahlung bis 200 nm. Die Absorption von Strahlung mit einer Wellenlänge unter 200 nm wurde aus technischen Gründen nicht gemessen. Abgesehen von der Absorption in diesem Bereich zeigt AMX drei relative Absorptionsmaxima bei 226, 230 und 273 nm. PIP zeigt ein relatives Maximum bei 275 nm und die Spektren von AMP und PEN lassen keine eindeutigen Maxima erkennen. Von den vier Antibiotika zeigt AMP die geringste Absorption im Bereich von 260-300 nm und PIP die höchste. Da nur wenig Strahlung mit einer Wellenlänge über 300 nm von den β -Lactam-Antibiotika absorbiert wird, ist der erwartete Einfluss von Sonnenlicht auf die direkte Photolyse dieser

3. Kinetik

Substanzen gering. Im Wellenlängenbereich über 300 nm absorbieren die getesteten β -Lactam-Antibiotika keine elektromagnetische Strahlung. Abb. 3b zeigt die Absorptionsspektren der Oxazolidinon-Antibiotika.

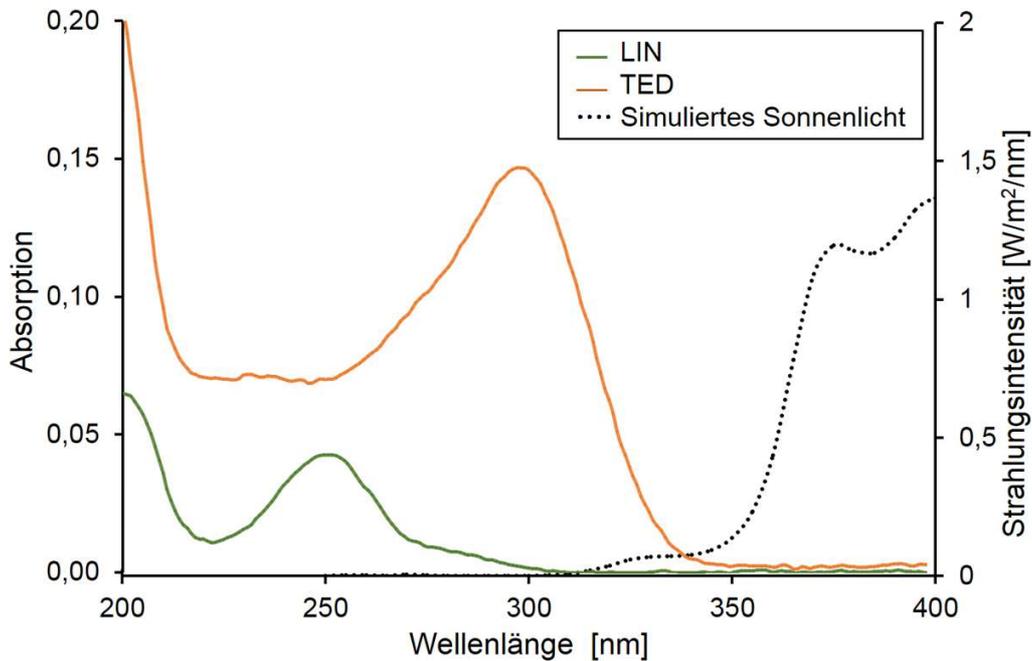


Abb. 3b: UV/Vis-Spektren von LIN und TED, 2 mg/L.

Abb. 3b zeigt, dass LIN kaum Strahlung im Bereich über 300 nm absorbiert und ein relatives Absorptionsmaximum bei 252 nm hat. Fasani et al. (2008) entdeckten für LIN neben dem Absorptionsmaximum bei 252 nm ein weiteres bei 259 nm, das aber in dem hier vorliegenden Spektrum nicht deutlich erkennbar ist.

TED hat ein Absorptionsmaximum bei 299 nm und absorbiert Strahlung mit einer Wellenlänge bis zu 340 nm, womit es die besten Voraussetzungen für den direkten photolytischen Abbau durch Sonnenlicht hat. Sichtbares Licht wird von keinem der Antibiotika absorbiert, sodass alle Lösungen farblos erscheinen.

3.1 Abbaukinetik unter simuliertem Sonnenlicht in Reinstwasser

Der photolytische Abbau von Mikroschadstoffen in Reinstwasser unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von photolytischen Prozessen in natürlichen Gewässern. Sofern keine weiteren Substanzen neben den abzubauenen Substanzen vorliegen, treten Prozesse wie Absorption und Streuung von Strahlung durch DOC und Partikel, Photosensibilisierung, Photokatalyse und mikrobieller Abbau nicht auf. Daher geben photolytische Abbauexperimente in Reinstwasser Auskunft über die Stabilität der Substanzen in Hinsicht auf direkte Photolyse. Hierdurch bietet sich eine einfache Vergleichbarkeit der photolytischen Stabilität verschiedener Antibiotika.

3.1.1 Abbaukinetik von β -Lactam-Antibiotika in Reinstwasser

Zur Bestimmung der photolytischen Reaktionskonstanten unter simuliertem Sonnenlicht wurden die β -Lactam-Antibiotikallösungen 24 h durchgehend bestrahlt und die Antibiotikakonzentrationen in Abb. 3.1.1 gegen die Bestrahlungsdauer aufgetragen.

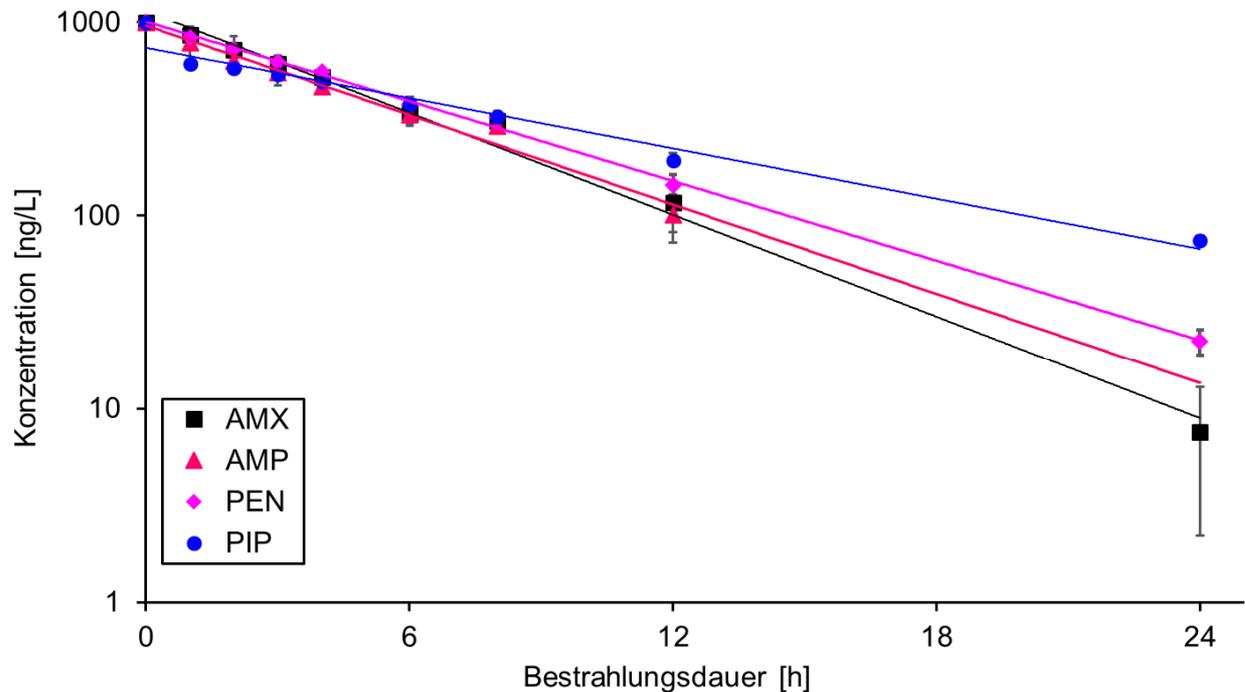


Abb. 3.1.1: Abbaukurven von β -Lactam-Antibiotika unter simuliertem Sonnenlicht (1 kW/m^2) in Reinstwasser bei 19°C , Fehlerbalken=1s, n=6.

Es zeigt sich, dass alle untersuchten β -Lactam-Antibiotika unter Sonnenlicht photolytisch abbaubar sind. Die exponentielle Abnahme (hier linear aufgrund der logarithmischen Skala) der Antibiotikakonzentrationen verdeutlicht, dass die Abbaureaktionen einer pseudoersten Reaktionsordnung folgen (Albini, 2016). Im Vergleich dazu zeigte sich in kein signifikanter Abbau (<5%) der β -Lactam-Antibiotika in den Dunkelkontrollen innerhalb von drei Tagen (Abb. Anhang 1). Die hydrolytische Stabilität der Antibiotika in den Dunkelkontrollen entspricht den Ergebnissen von Hirte et al. (2016), die für AMX dabei eine hydrolytische Halbwertszeit von sechs Tagen bei 30°C und pH 7 bestimmten. Die Temperatur im Sonnenlichtsimulator war mit 19°C deutlich kühler, weswegen der hydrolytische Abbau in diesem Zeitraum nicht mehr messbar war.

Die Aminopenicilline AMX und AMP werden photolytisch schneller abgebaut als PEN und PIP, was bereits von He et al. (2014) beschrieben wurde. Die Halbwertszeiten unter diesen Bedingungen betragen 3,3 h für AMX, 3,9 h für AMP, 4,4 h für PEN und 7,0 h für PIP. Tabelle 3.1.3 (Seite 40) vergleicht diese Werte mit dem photolytischen Abbau anderer Antibiotika. Um zu klären, ob der Kohlenstoff der β -Lactam-Antibiotika photolytisch bis hin zu anorganischem Kohlenstoff wie Kohlendioxid, Kohlensäure oder (Hydrogen-) Carbonat

3. Kinetik

oxidiert werden kann, wurde die Mineralisierung der Antibiotika untersucht. Hierzu wurden die TOC-Konzentrationen in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer gemessen. Da die bisher verwendete Konzentration von 1 µg/L unterhalb der Empfindlichkeit des TOC-Analyzers liegt, wurden zur Bestimmung der Mineralisierungsrate Lösungen mit je 40 mg/L eines β-Lactam-Antibiotikums mit UV₂₅₄-Licht bestrahlt. Aufgrund der starken Strahlungsabsorption der konzentrierten Antibiotikallösungen konnte die Untersuchung der Mineralisierung ähnlich wie die Toxizitätstests nicht mit simuliertem Sonnenlicht, sondern nur mit UV₂₅₄-Licht durchgeführt werden. Abb. Anhang 2 zeigt, dass nach 6 h UV₂₅₄-Bestrahlung nur 20% des Kohlenstoffs mineralisiert wurde. Während der Bestrahlung konnte die Entstehung kleiner Gasbläschen in den Reagenzgläsern beobachtet werden, was die Bildung von Kohlendioxid vermuten lässt. Die Halbwertszeiten der Antibiotika unter UV₂₅₄-Licht liegen bei 1,2 min für PEN, 4 min für AMX und AMP sowie 7 min für PIP.

Der geringe Mineralisationsgrad zeigt, dass ein Großteil der β-Lactam-Antibiotika zu TPs reagiert. Auch dies wurde bereits von He et al. (2014) gezeigt. 5-7% der Mineralisierung kann durch die Decarboxylierung erklärt werden, die in Kapitel 4.1.3 (Seite 49) beschrieben wird. Während der Bestrahlung wurden die Lösungen gelblich bis bräunlich, was auf die Bildung von Abbauprodukten mit einem konjugierten π-Elektronensystem hindeuten kann (Atkins und de Paula, 2006). Bei diesem Experiment muss beachtet werden, dass die Strahlung des Sonnenlichts deutlich langwelliger ist als das verwendete UV₂₅₄-Licht. Unter Umweltbedingungen ist die solarinduzierte Mineralisierung deutlich langsamer.

3.1.2 Abbaukinetik von Oxazolidinon-Antibiotika in Reinstwasser

Abb. 3.1.2 zeigt den photolytischen Abbau von LIN und TED unter simuliertem Sonnenlicht. Im Gegensatz zu Abb. 3.1.1 ist die Abszisse wegen der längeren Versuchsdauer auf 168 h skaliert.

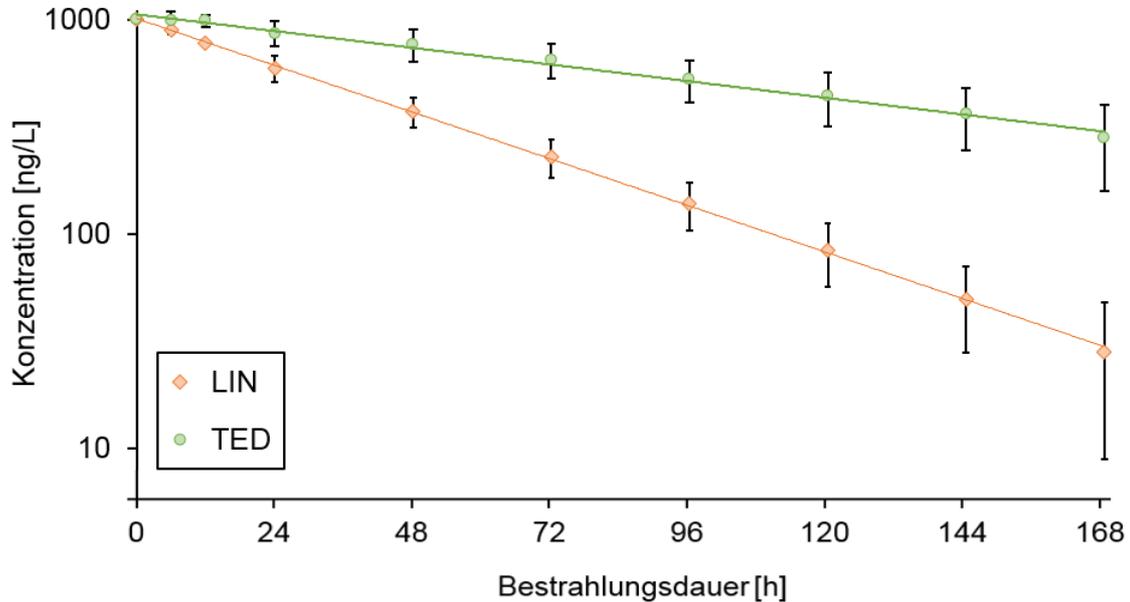


Abb. 3.1.2: Abbaukurven von Oxazolidinon-Antibiotika unter simuliertem Sonnenlicht (1 kW/m^2) in Reinstwasser bei 19° C , Fehlerbalken=1s, n=12.

LIN und TED konnten experimentell unter simuliertem Sonnenlicht abgebaut werden. Die photolytischen Halbwertszeiten lagen bei 32,4 h für LIN und 92,5 h für TED. Obwohl TED eine wesentlich höhere Lichtabsorption im Bereich über 300 nm zeigt, ist diese Substanz deutlich photostabiler als LIN. Bei den Dunkelkontrollen beider Antibiotika wurde ein Konzentrationsrückgang von 10% über sieben Tage gemessen (Abb. Anhang 3), was einer hydrolytischen Halbwertszeit von 46 Tagen entspricht. Da die Stammlösungen der Oxazolidinon-Antibiotika mit Acetonitril angesetzt wurden, war eine Untersuchung der photolytischen Mineralisierung nicht möglich. Die Halbwertszeiten unter UV_{254} -Licht lagen bei 12 s für LIN und 42 min für TED, was eine vergleichsweise geringe Photostabilität von LIN unter UV_{254} -Licht verdeutlicht. Die photolytische Abbaubarkeit von LIN durch UV_{254} -Licht wurde bereits von Fasani et al. (2008) und Martin et al. (1999) ohne Angaben zur Kinetik beschrieben.

Tedizolid-Phosphat wurde zwar als photolytisch nicht abbaubar beschrieben (Lei et al., 2017), jedoch wurde Substanz dabei im trockenen Zustand bestrahlt. Vergleichsdaten zur photolytischen Kinetik beider Substanzen wurden nicht gefunden.

3.1.3 Vergleich der direkten Photolyse verschiedener Antibiotika

Die Reaktionskonstanten und die Halbwertszeiten der direkten Photolyse der Antibiotika wurden über die F. 1 und 2 (Seite 19-20) berechnet. Tabelle 3.1.3 fasst die Reaktionskonstanten zusammen und vergleicht diese mit denen anderer Antibiotika.

Tab. 3.1.3: Vergleich der photolytischen Abbaukonstanten von Antibiotika unter simuliertem Sonnenlicht.

Substanz	Reaktionskonstante [1/h]	Halbwertszeit [h]	Antibiotikaklasse	Quelle
AMX	0,21 ± 0,04	3,32 ± 0,61	β-Lactam	Diese Studie
AMP	0,18 ± 0,02	3,89 ± 0,43		
PEN	0,16 ± 0,01	4,37 ± 0,22		
PIP	0,10 ± 0,01	6,99 ± 0,45		
LIN	0,022 ± 0,004	32,4 ± 5,7	Oxazolidinon	Diese Studie
TED	0,008 ± 0,002	92,5 ± 24,2		
AMX	0,0019	367 ± 23	β-Lactam	Xu et al., 2011 ^{a)}
Sulfamethoxazol	1,88 ± 0,15	0,37	Sulfonamid	Lam et al., 2014 ^{b)}
Levofloxacin	2,17 ± 0,07	0,32 ± 0,01	Fluoroquinolon	
Sulfamethoxazol	3,1	0,22	Sulfonamid	Batchu et al., 2014 ^{c)}
Roxithromycin	0,0057	122	Makrolid	
Erythromycin	0,012	56		
Ciprofloxacin	0,41	1,7	Fluoroquinolon	
Difloxacin	0,82	0,84	Fluoroquinolon	Prabhakaran et al., 2009 ^{d)}
Sarafloxacin	0,26	0,82		

a) 320-800 nm, 590 W/m² (laut Herstellerangabe: Luzchem LZW)

b) 300-800 nm, 765 W/m²

c) 300-800 nm, 750 W/m²

d) 290-800 nm, 500 W/m²

3. Kinetik

Bisher gibt es kein vereinheitlichtes Verfahren zur Bestimmung photolytischer Reaktionskonstanten unter simuliertem Sonnenlicht. Je nach Studie wurden unterschiedliche optische Filter und Strahlungsintensitäten verwendet sowie mit verschiedenen Antibiotikakonzentrationen und Puffern gearbeitet, was einen Vergleich der Studien untereinander erschwert. Beispielsweise liegen hier für Sulfamethoxazol zwei photolytische Reaktionskonstanten vor: 1,88 1/h und 3,1 1/h. Paradoxe Weise ist die geringere Konstante mit einer stärkeren Strahlungsquelle erzielt worden. Besonders überraschend ist, dass Xu et al. (2011) eine extrem niedrige Reaktionskonstante für den photolytischen Abbau von AMX angeben, die nahezu der hydrolytischen Konstante von 0,0016 1/h entspricht, sodass nach dieser Studie der Einfluss direkter Photolyse auf den Abbau von AMX unter Umweltbedingungen nahezu auszuschließen ist. Dieses Ergebnis wurde mit einer Strahlung im Bereich über 320 nm erzielt. Wie Abb. 3a zeigt, absorbiert AMX jedoch keine Strahlung im Bereich über 320 nm und kann daher nicht mit einer solchen Strahlungsquelle angeregt werden.

Der Vergleich der Reaktionskonstanten in Tab. 3.1.3 lässt trotz der unterschiedlichen Strahlungsquellen erkennen, dass die photolytische Stabilität der Antibiotika stark mit den Antibiotikaklassen zusammenhängt. So sind Oxazolidinon- und Makrolid-Antibiotika sehr photostabil, während Fluorquinolon-Antibiotika und Sulfamethoxazol unter Sonnenlicht besonders schnell abgebaut werden können. β -Lactam-Antibiotika bilden im Bezug zur photolytischen Stabilität den Median dieser fünf Antibiotikaklassen.

3.2 Abbaukinetik unter simuliertem Sonnenlicht in Oberflächenwasser

Da in Oberflächenwasser viele Parameter wie pH, Trübung und indirekte Photolyse den Abbau von Mikroschadstoffen durch Sonnenlicht beeinflussen, ist zu klären, ob Sonnenlicht auch in Oberflächenwasser Antibiotika abbauen kann. Insbesondere TOC ist ein wichtiger Parameter, der photolytische Reaktionen durch die Abschwächung der Strahlung, aber auch als Photosensibilisierer beeinflusst. Der photolytische Abbau der Antibiotika wurde in zwei verschiedenen Oberflächenwässern (OW 1: Rhein, OW 2: Alb) untersucht. Zunächst wurden TOC, CSB, pH und Trübung bestimmt.

3.2.1 Abbaukinetik von β -Lactam-Antibiotika in Oberflächenwasser

Die Daten der physikalischen und chemischen Eigenschaften der verwendeten Oberflächenwässer OW 1 und OW 2 werden in Tab. 3.2.1 wiedergegeben.

Tab. 3.2.1: Physikalische und chemische Eigenschaften der verwendeten Oberflächenwässer für die Untersuchung der Photolyse von β -Lactam-Antibiotika.

Probenahmestelle	Rhein, Wörth (OW 1)	Alb, Karlsruhe (OW 2)
TOC [mg/L]	12	79
CSB [mg/L]	14	48
Trübung [NTU]	70	90
pH	7,8	7,5

OW 2 unterscheidet sich insbesondere durch die deutlich höheren Konzentrationen an TOC und CSB von OW 1. Die Trübung mindert durch die Absorption und Streuung der Strahlung die Lichtintensität im Wasser und könnte damit die Kinetik photolytischer Reaktionen verlangsamen. Zur Bestimmung der Reaktionskonstanten wurden OW 1 und OW 2 mit den vier β -Lactam-Antibiotika versetzt und die Konzentrationen über eine Dauer von 168 h verfolgt. Abb. 3.2.1 zeigt die Reaktionskonstanten des Abbaus von β -Lactam-Antibiotika in Oberflächenwasser mit (hell) und ohne (dunkel) Bestrahlung.

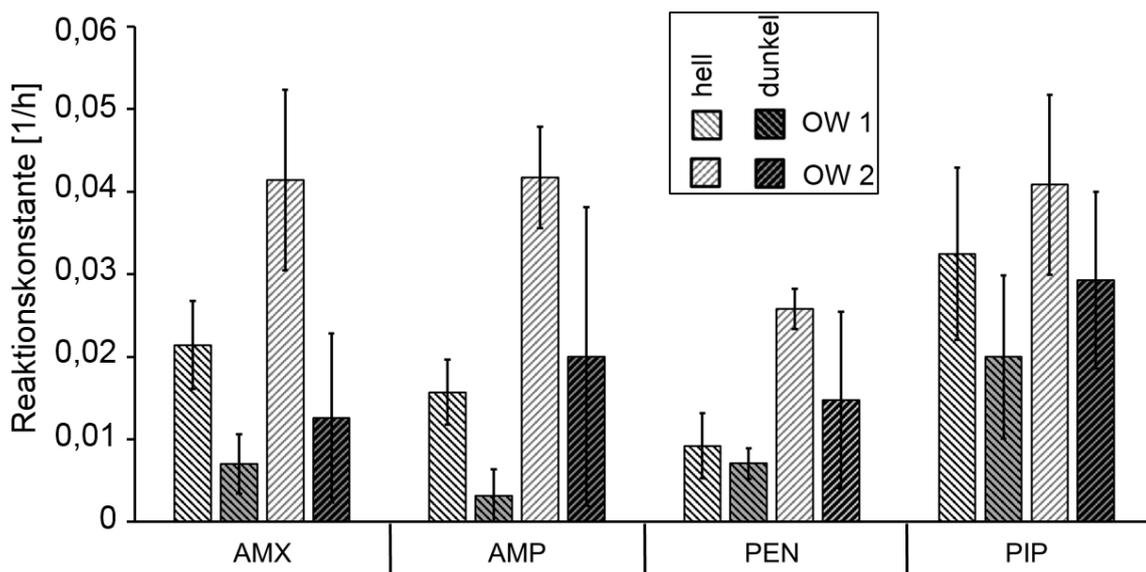


Abb. 3.2.1: Reaktionskonstanten pseudoerster Ordnung des Abbaus von β -Lactam-Antibiotika in Oberflächenwasser (OW 1: Rhein, OW 2: Alb) mit und ohne Bestrahlung durch simuliertes Sonnenlicht (1 kW/m^2) bei $19 \text{ }^\circ\text{C}$, Fehlerbalken=1s, n=4.

Abb. 3.2.1 zeigt, dass die untersuchten β -Lactam-Antibiotika in Oberflächenwasser mit und ohne Sonnenlicht abgebaut werden (Tab. Anhang 1). Der Rückgang der Antibiotikakonzentrationen in den Dunkelkontrollen lässt sich durch mikrobiellen Abbau und

3. Kinetik

durch Adsorption an TOC und partikulären Stoffen erklären. Die Konzentration aller vier β -Lactam-Antibiotika geht sowohl bei den bestrahlten als auch bei den unbestrahlten Proben in OW 2 schneller zurück als in OW 1. Der schnellere Rückgang in den Dunkelkontrollen von OW 2 kann durch Adsorption und mikrobiellen Abbau erklärt werden. Zwar wurden Mikroorganismen in den Oberflächenwässern nicht quantifiziert, jedoch kann mit dem höheren TOC in OW 2 eine größere Anzahl an Mikroorganismen vermutet werden.

Weiterhin zeigt sich, dass die Konzentrationen an β -Lactam-Antibiotika unter Bestrahlung schneller zurückgingen als in den Dunkelkontrollen. Eine Reihenfolge der Photostabilität konnte in diesem Experiment nicht beobachtet werden.

Der Vergleich von Abb. 3.1.1 und Abb. 3.2.1 ergibt, dass der photolytische Abbau von β -Lactam-Antibiotika in Oberflächenwasser deutlich langsamer abläuft als in Reinstwasser. Grund hierfür kann die Absorption der Strahlung durch TOC sein. Dennoch sieht man unter Berücksichtigung der Standardabweichung, dass Sonnenlicht den Abbau von β -Lactam-Antibiotika in Oberflächenwasser beschleunigt. Ob in Oberflächenwasser direkte Photolyse oder photosensible Reaktionen über DOC vorrangig für den Abbau der Antibiotika ist, kann in diesem Experiment nicht geklärt werden. Xu et al. (2011) zeigten, dass Strahlung mit einer Wellenlänge über 320 nm DOC wie Huminstoffe anregt, die dann als Photosensibilisierer AMX abbauen, während direkte Photolyse von AMX mit einem solchen Spektrum nicht beobachtet wurde. Daraus lässt sich folgern, dass der direkte photolytische Abbau überwiegend durch Strahlung im Bereich über 320 nm verursacht wird. Im Umkehrschluss kann jedoch nicht bestimmt werden, ob und in welchem Ausmaß Strahlung im Bereich unter 320 nm direkt und indirekt photolytisch wirkt.

Im Vergleich zu den Ergebnissen von Xu et al. ist der Abbau von AMX in natürlichen Oberflächengewässern deutlich langsamer. Xu et al. hatten Reaktionskonstanten zwischen 0.009 und 0.031 1/h für den photosensiblen Abbau von AMX bestimmt, dass in Gegenwart von Huminsäuren als Photosensibilisierer bestrahlt wurde. In natürlichen Gewässern sind jedoch neben Huminsäuren zahlreiche andere organische und anorganische Stoffe vorhanden, die die Kinetik der indirekten Photolyse beeinflussen. Es ist möglich, dass noch zahlreiche weitere Stoffe als Photosensibilisierer in der aquatischen Umwelt fungieren können und damit die indirekte Photolyse vermitteln.

Dass OW 2 trotz des höheren TOC und der höheren Trübung zu einem schnelleren photolytischen Abbau der β -Lactam-Antibiotika führt, deutet darauf hin, dass möglicherweise photosensible Reaktionen zum indirekten photolytischen Abbau der β -Lactam-Antibiotika beitragen. Ebenso ist möglich, dass der schnellere Abbau der Antibiotika in OW 2 durch mikrobiologischen Abbau oder durch Adsorption geschieht. Dies lässt sich auch in den Dunkelkontrollen erkennen. Letztendlich kann anhand der Daten nicht geklärt werden, warum die Antibiotikakonzentrationen in OW 2 schneller zurückgehen.

3.2.2 Abbaukinetik von Oxazolidinon-Antibiotika in Oberflächenwasser

Um den photolytischen Abbau der Oxazolidinon-Antibiotika in natürlichen Gewässern zu untersuchen, wurden zwei weitere Wasserproben genommen. Es handelt sich hierbei um die gleichen Probenahmestellen wie die Oberflächenwässer in Tab. 3.2.1, wobei die Proben in Tab. 3.2.2 zu einem späteren Zeitpunkt den Flüssen entnommen wurden.

Tab. 3.2.2: Kennzahlen der verwendeten Oberflächenwässer.

Probenahmestelle	Rhein, Wörth (OW 1)	Alb, Karlsruhe (OW 2)
TOC [mg/L]	1,8	3,9
CSB [mg/L]	6,7	12
Trübung [NTU]	3,2	3,0
pH	7,3	7,1

Ähnlich wie in Tab. 3.2.1, zeigt OW 2 wieder deutlich höhere Konzentrationen an TOC und CSB. Auffällig ist, dass beide Proben insgesamt deutlich niedrigere TOC-, CSB- und Trübungswerte aufweisen als in Tab. 3.2.1. Dies kann gegebenenfalls mit saisonalen Schwankungen erklärt werden. Abb. 3.2.2 zeigt die Reaktionskonstanten des Abbaus von Oxazolidinon-Antibiotika in Reinstwasser und Oberflächenwasser jeweils mit (hell) und ohne (dunkel) Bestrahlung durch simuliertes Sonnenlicht.

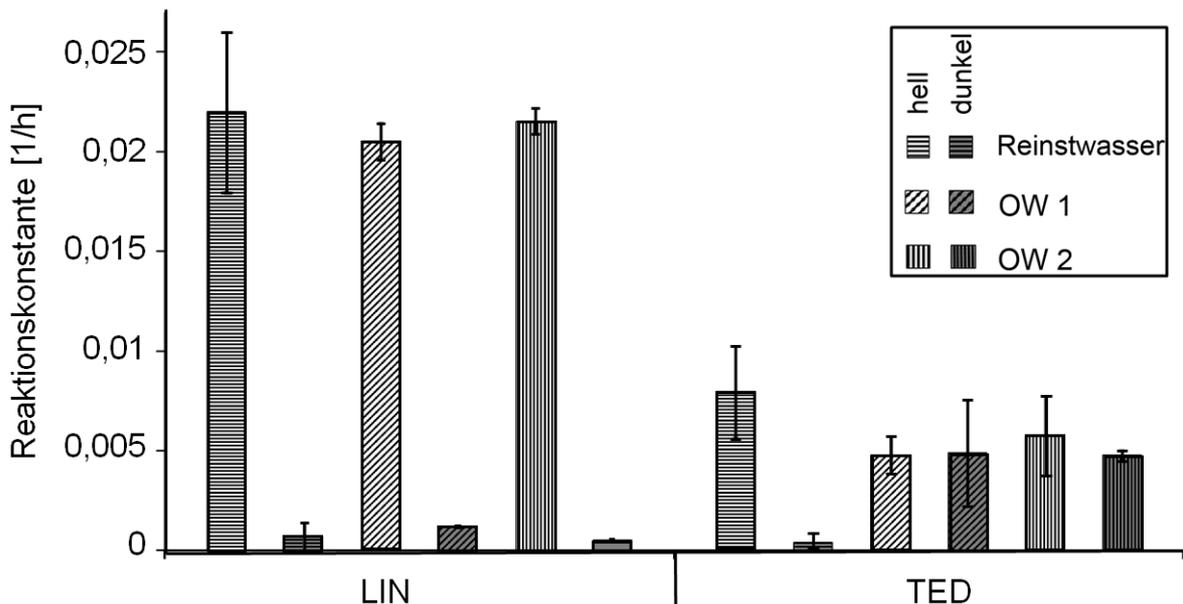


Abb. 3.2.2: Reaktionskonstanten pseudoerster Ordnung des Abbaus von Oxazolidinon-Antibiotika in Reinstwasser und Oberflächenwasser (OW 1: Rhein, OW 2: Alb) mit und ohne Bestrahlung durch simuliertes Sonnenlicht (1 kW/m^2) bei $19 \text{ }^\circ\text{C}$, Fehlerbalken=1s, n=6.

Abb. 3.2.2 lässt erkennen, dass LIN auch in Oberflächenwasser photolytisch abbaubar ist (Tab. Anhang 2). Während der Rückgang der Konzentration von LIN in den unbestrahlten Oberflächenwässern bei Reaktionskonstanten zwischen 0,0005 und 0,0012 1/h liegt, konnte

3. Kinetik

die Bestrahlung einen Abbau mit Reaktionskonstanten zwischen 0,021 und 0,022 1/h bewirken. Dass trotz der Absorption von Strahlung durch TOC keine Verminderung der Abbaukinetik auftritt, kann auf photosensiblen Abbau hindeuten.

TED verhält sich deutlich anders in Oberflächenwasser als in Reinstwasser. Bei TED konnte kein deutlicher Unterschied in der Kinetik der bestrahlten und unbestrahlten Antibiotika gesehen werden. Sowohl mit als auch ohne Bestrahlung ging die Konzentration von TED mit einer ähnlichen Abbaurate zurück und zeigte Reaktionskonstanten zwischen 0,005 und 0,006 1/h. Während TED in Reinstwasser direkt photolytisch abbaubar ist, konnte im Oberflächenwasser kein Effekt durch die Bestrahlung mit simuliertem Sonnenlicht gesehen werden. Trotz unterschiedlicher TOC-Werte in den Oberflächenwässern zeigten beide Oxazolidinon-Antibiotika keinen erkennbaren Unterschied in der Abbaukinetik zwischen OW 1 und OW 2. Aufgrund der deutlichen Unterschiede der entnommenen Wasserproben sind die Ergebnisse von 3.2.1 und 3.2.2 nicht miteinander vergleichbar.

4. Strukturaufklärung von Transformationsprodukten

Die Untersuchung der kinetischen Abbaurate brachte hervor, dass Sonnenlicht zwar zum Abbau von Antibiotika führen kann, jedoch nicht zu deren vollständigen Mineralisierung. Dass selbst UV₂₅₄-Licht nur 20% des Kohlenstoffs der β -Lactam-Antibiotika mineralisieren kann, verdeutlicht, dass die Antibiotika photolytisch in TPs umgewandelt werden. Die Aufklärung der Strukturen der TPs kann Auskunft über die Wirkung der TPs geben. Insbesondere ist von Interesse, ob der β -Lactam- und Oxazolidinonring verändert werden, da diese Ringe ausschlaggebend für die antibakterielle Wirkung der Substanzen sind. Weiterhin ist die Strukturaufklärung relevant, um mithilfe von Referenzstandards die Kinetik der Bildung und des Abbaus der TPs sowie die Wirkung von Einzelsubstanzen bestimmen zu können.

Die Photolyse der vier untersuchten β -Lactam-Antibiotika ergab mehrere gemeinsame photolytische Reaktionen, sodass die Strukturvorschläge für die vier Substanzen zusammengefasst wurden. LIN und TED zeigten sowohl in der Kinetik, als auch in Bezug auf die TPs, große Unterschiede, weswegen jedem der beiden Oxazolidinon-Antibiotika ein eigenes Unterkapitel über die Umwandlung in TPs gewidmet wurde. Bei den angegebenen m/z-Werten handelt es sich durchgehend um m/z (+) -Werte.

4.1 Photolytische Umwandlung von β -Lactam-Antibiotika

Sowohl bei der Photolyse durch simuliertes Sonnenlicht, als auch durch UV₂₅₄-Licht konnten fünf Umwandlungsreaktionen bei den β -Lactam-Antibiotika beobachtet werden. Es wurden keine TPs gefunden, die nur unter einer Strahlungsquelle entstanden. Mit den MS²-Spektren konnten Strukturen für ein TP von AMX, drei von AMP, fünf von PEN und vier von PIP rekonstruiert werden. Tab. Anhang 3 fasst die Strukturformeln der TPs der β -Lactam-Antibiotika zusammen.

4.1.1 Epimerisierung von PEN

PEN bildete zwei vermutliche Epimere (PEN TPa und PEN TPb) mit kürzeren Retentionszeiten als PEN. Die MS²-Spektren der beiden TPs (Abb. Anhang 12) zeigten die identischen Fragmente wie unbestrahltes PEN (Abb. Anhang 10). Insbesondere die Fragmente bei m/z 160,0428 (entsprechend C₆H₁₀NO₂S⁺) und 192,0656 (entsprechend C₁₀H₁₀NO₃⁺) deuten darauf hin, dass es sich bei diesen beiden TPs um die gleiche Molekülstruktur handelt wie PEN, da diese Fragmente einem Bindungsbruch durch den β -Lactamring zugeordnet werden (Längin et al., 2009; Nägele, 2005). Die Photolyse der deuterierten Substanz PEN-D5 konnte die Bildung der Epimere und die Zuordnung der Fragmente bestätigen. Die Fragmente von PEN-D5 (Abb. Anhang 11) und der dazugehörigen Epimere (PEN TPa-D5 und PEN TPb-D5; Abb. Anhang 13-14) lagen bei m/z 160,0 und 197,1. Basierend auf den MS²-Spektren liegen die Strukturvorschläge der

4. Transformationsprodukte

Epimere auf dem Konfidenzgrad 3 nach Schymanski (2014), da eine Umlagerung der Carboxy- oder der Carbonylgruppe durch die MS²-Spektren nicht auszuschließen ist – auch wenn diese unwahrscheinlich sind und solche Reaktionen in der Literatur nicht gefunden wurden. PEN besitzt drei Stereozentren. Abb. 4.1.1 zeigt, dass bei PEN das Schwefelatom des Thiazolidinrings und das Amin in *cis*-Stellung am β -Lactamring angeordnet sind, während die Carboxygruppe des Thiazolidinrings in *trans*-Stellung steht.

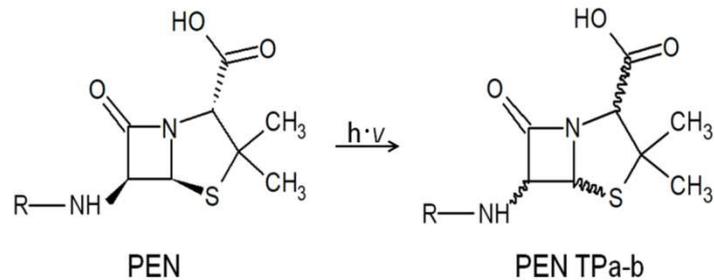


Abb. 4.1.1 Photolytisch angeregte Epimerisierung von PEN.

Die Bildung von Epimeren wurde schon von Hirte et al. (2016) beim hydrolytischen Abbau von AMX beschrieben. Die photolytische Bildung von Epimeren von β -Lactam-Antibiotika wurde jedoch bisher nicht in der Literatur gefunden. PEN hat drei Stereozentren und kann daher drei weitere Diastereomere bilden. Welche zwei Stereozentren bei den entdeckten Epimeren photolytisch geändert wurden, lässt sich anhand der MS²-Spektren nicht erschließen. Epimere von AMX, AMP und PIP wurden in dieser Studie nicht entdeckt.

4.1.2 Öffnung des β -Lactamrings

Alle vier β -Lactam-Antibiotika zeigten ein TP mit einem Massengewinn von m/z 18,0106 (TPs 1, Abb. Anhang 5, 7, 15, 16, 22). Die Zunahme an Masse entspricht einem Wassermolekül. In den MS²-Spektren aller vier β -Lactam-Antibiotika konnte das zuvor beschriebene Fragment bei m/z 160,0428 (entsprechend C₆H₁₀NO₂S⁺) entdeckt werden, das dem Thiazolidinring zugeordnet wird. Daher ist wahrscheinlich, dass der β -Lactamring durch die Strahlung zur hydrolytischen Öffnung angeregt wurde. Dabei wird die σ -Bindung zwischen der Carbonylgruppe und dem Amid gespalten. Abb. 4.1.2 zeigt die Umwandlung des β -Lactamrings zu TP1.

4. Transformationsprodukte

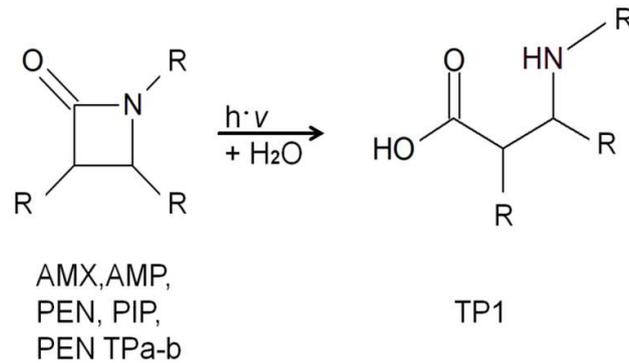


Abb. 4.1.2a: Öffnung des β -Lactamrings.

Im Fall von PEN wurde dieser Transformationsweg durch den Referenzstandard Penicilloinsäure (PEN TP1) verifiziert und entspricht damit dem Konfidenzgrad 1. Die Ringöffnung von AMX zu AMX TP1 konnte mit einem Referenzspektrum (Nägele, 2005) bestätigt werden und entspricht somit dem Konfidenzgrad 2a. Die Reaktivität des β -Lactamrings hinsichtlich der hydrolytischen Ringöffnung wurde bereits häufig beschrieben (Hirte et al., 2016; Längin et al., 2009; Li et al., 2008; Mitchell et al., 2014). Die Entstehung und der Abbau von PEN TP1 wurde über die Bestrahlungsdauer quantifiziert und in Abb. 4.1.2b aufgetragen, um die Kinetik der Bildung und des Abbaus von PEN TP1 zu bestimmen.

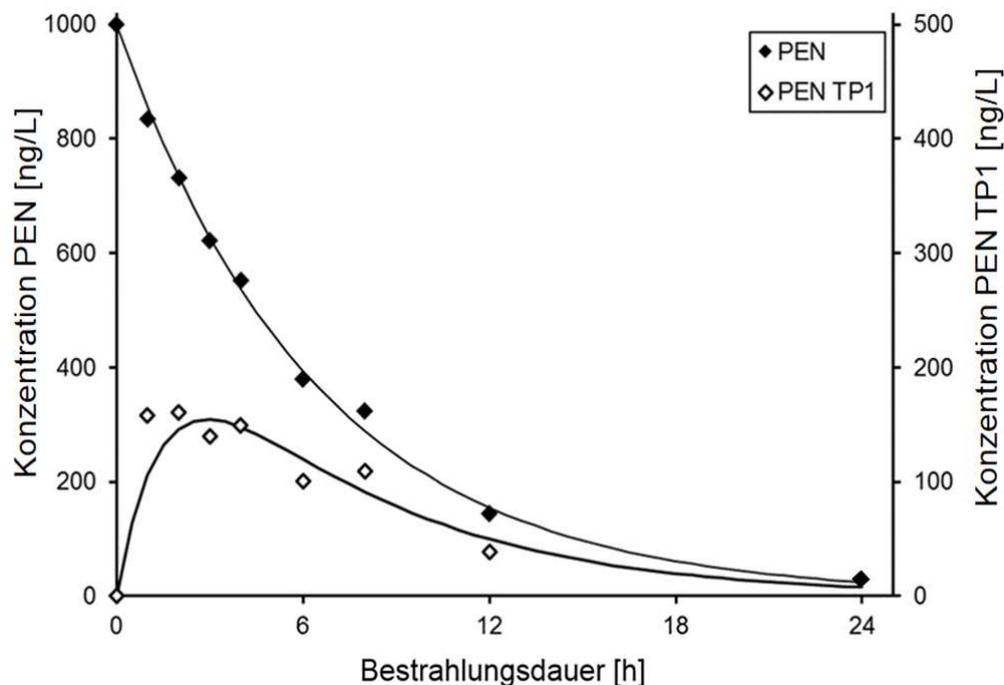


Abb. 4.1.2b: Konzentrationen von PEN und von PEN TP1 während einer Bestrahlung durch simuliertes Sonnenlicht, $k_{\text{Bildung}} = 0,16 \text{ 1/h}$, $k_{\text{Abbau}} = 0,64 \text{ 1/h}$.

PEN TP1 konnte bereits nach 1 h Bestrahlung nachgewiesen werden. Die maximale Konzentration an PEN TP1 von $160 \pm 54 \text{ ng/L}$ wurde nach 2 h gemessen. Das entspricht

4. Transformationsprodukte

$15 \pm 5,2\%$ der ursprünglichen Stoffmenge von PEN. Zu diesem Zeitpunkt hatten sich bereits $27 \pm 1,4\%$ PEN abgebaut. Daraus kann geschlossen werden, dass an diesem Zeitpunkt $12 \pm 6,6\%$ der ursprünglichen Stoffmenge als andere TP's vorlagen. Da die anderen TP's ohne Referenzstandards nicht quantifiziert werden konnten, war eine weitergehende Massenbilanzierung nicht möglich. In den folgenden 22 h nahm die Konzentration kontinuierlich auf bis $4,4 \pm 4,4$ ng/L ab. Es lässt sich daraus schließen, dass PEN TP1 ebenfalls durch Sonnenlicht abbaubar ist. Für die Berechnung der Abbaukonstante von PEN TP1 über F. 4 (Seite 31) wurde angenommen, dass es sich hierbei um ein primäres TP handelt – auch wenn die Bildung von PEN TP1 ebenso aus PEN TPa-b möglich ist. Ob PEN TP1 überwiegend aus PEN oder aus PEN TPa-b gebildet wurde, kann nicht ohne Referenzstandards der verschiedenen Epimere bestimmt werden. Die Abbaukonstante von PEN TP1 zeigt, dass PEN TP1 photolytisch deutlich instabiler als PEN ist. Der Abbau von den TP1 zeigte zwei separate Reaktionen, die zur Bildung von TP2 und TP3 führten.

4.1.3 Decarboxylierung

AMP, PEN und PIP zeigten ein weiteres TP, das eine um m/z 43,9898 geringere Masse als die TP's 1 auswies. Da diese Abnahme der Masse von Kohlendioxid entspricht, liegt eine Decarboxylierung nahe. Alle TP's 1 verfügen über zwei Carboxygruppen: eine am Thiazolidinring und eine, die durch die hydrolytische Öffnung des β -Lactamrings entstanden ist. Die MS^2 -Spektren der TP's 2 (Abb. Anhang 8, 17, 18, 23) zeigen ein Fragment bei m/z 174,0585 (entsprechend $C_7H_{12}NO_2S^+$), das durch einen Bindungsbruch der C-N Bindung entstehen kann. Dieses Fragment zeigt, dass die verbleibende Carboxygruppe am Thiazolidinring gebunden ist und die Carboxygruppe, die durch die Öffnung des β -Lactamrings entstanden ist, vom Molekül entfernt wurde. Abb. 4.1.3 zeigt die Reaktion.

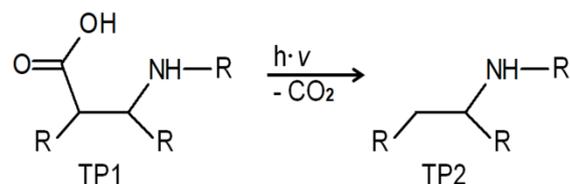


Abb. 4.1.3: Decarboxylierung von TP1 zu TP2.

Die Decarboxylierung von TP's 1 wurde bisher häufig als sekundäre Reaktion von β -Lactam-Antibiotika beschrieben (Hirte et al., 2016; Li et al., 2008; Nägele und Moritz, 2005). Nach Wissen des Autors ist keine pharmazeutische Wirkung der TP's 1 und TP's 2 bekannt.

4. Transformationsprodukte

4.1.4 Abspaltung von Dimethyl-thiazolidinsäure

Ein weiteres TP von AMP, PEN und PIP zeigte gegenüber TPs 1 eine um m/z 160,0436 verringerte Masse. Die Massendifferenz entspricht einer Abspaltung von Dimethyl-thiazolidinsäure ($C_6H_{10}NO_2S$). Keines der MS^2 -Spektren der TPs 3 (Abb. Anhang 9, 19, 20, 24) zeigte Fragmente bei m/z 160,0432 ($C_6H_{10}NO_2S^+$) oder 114,0373 ($C_5H_{10}NS^+$), die der Dimethyl-thiazolidinsäure zugeschrieben werden. Dadurch lässt sich die Hypothese der Abspaltung von Dimethyl-thiazolidinsäure bestätigen. Abb. 4.1.4 zeigt den Reaktionsmechanismus, der zur Bildung der TPs 3 führt.

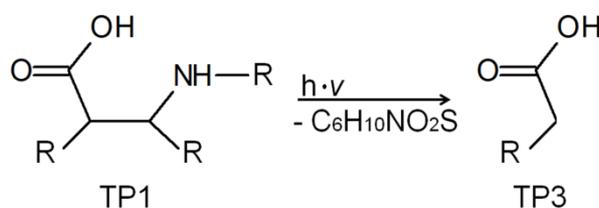


Abb. 4.1.4: Abspaltung von Dimethyl-thiazolidinsäure.

Das MS^2 -Spektrum von AMP TP3 zeigte insgesamt sechs Fragmente, die sich dem Strukturvorschlag von AMP TP3 zuordnen ließen. Weiterhin wurde die Struktur von AMP TP3 mit dem Referenzstandard 2-[[2-Amino(phenyl)acetamido]methyl]-5,5-dimethyl-1,3-thiazolidin-4-Carbonsäure verifiziert und entspricht damit dem Konfidenzgrad 1, während PEN TP3 und PIP TP3 den Konfidenzgrad 3 aufweisen. Nach Wissen des Autors wurde dieser Reaktionsweg zuvor nicht für den Abbau von Penamen beschrieben. Junza et al. (2014) entdeckten diese Reaktion beim thermischen Abbau von Cephapirin in Milch. Ein vergleichbarer Bindungsbruch bei den TPs 2 wurde nicht beobachtet. Dimethyl-thiazolidinsäure oder TPs mit davon abgeleiteten Strukturen wurden ebenfalls nicht gefunden, obwohl diese nach der Abspaltung von den TPs 3 in der Lösung vorliegen müssten. Die Ursache dafür kann sein, dass derart kleine polare Substanzen mit der verwendeten Methode nicht gut erfasst werden können.

4.1.5 Bildung von 1-Ethylpiperazin-2,3-dion

PIP TP4 wurde bei m/z 143,0815 entdeckt und konnte der Summenformel $C_6H_{10}N_2O_2$ zugeordnet werden. Das signalstärkste Fragment im MS^2 -Spektrum (Abb. Anhang 25) bei m/z 115,0503 entspricht dem Piperazindionring ($C_4H_7N_2O_2^+$). Dadurch wurde 1-Ethylpiperazin-2,3-dion als viertes TP von PIP vorgeschlagen und durch einen Referenzstandard verifiziert. Wie in Abb. 4.1.5 gezeigt, kann PIP TP4 durch einen einfachen Bindungsbruch zwischen einer Carbonylgruppe und einem Amid von PIP gelöst werden.

4. Transformationsprodukte

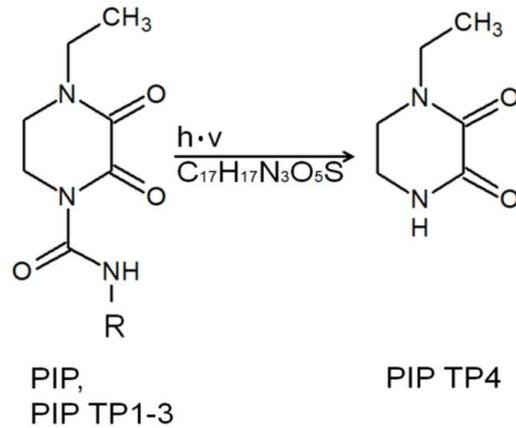


Abb. 4.1.5a: Bildung von PIP TP4.

Die Entstehung und der Abbau von PIP TP4 wurde in Abb. 4.1.5b dargestellt.

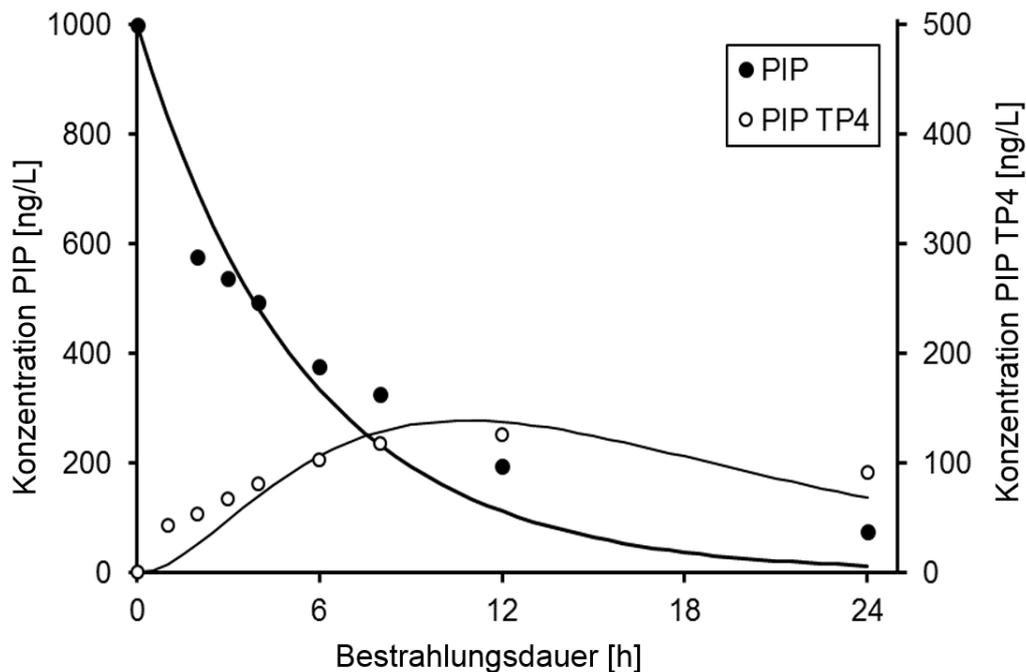


Abb. 4.1.5b: Konzentrationen von PIP und von PIP TP4 während einer Bestrahlung durch simuliertes Sonnenlicht, $k_{\text{Bildung}} = 0,32 \text{ 1/h}$, $k_{\text{Abbau}} = 0,32 \text{ 1/h}$.

Die Konzentration von PIP TP4 stieg innerhalb von 12 h auf ein Maximum von $126 \pm 13 \text{ ng/L}$ an und sank in den folgenden 12 h auf $91 \pm 27 \text{ ng/L}$. Mit einer Abbaurrate von $0,32 \text{ 1/h}$ ist PIP TP4 photolytisch instabiler als das ursprüngliche Edukt PIP. Ob PIP TP4 ein primäres, sekundäres oder tertiäres TP ist, kann ohne Referenzstandards der Intermediate PIP TP1-3 nicht geklärt werden. Es ist denkbar, dass der Bindungsbruch am Piperazindionring sowohl bei PIP als auch bei PIP TP1-3 geschieht. Trotz ausführlichem Screening wurden keine TPs entschlüsselt, denen der Piperazindionring fehlt. Möglicherweise bildete sich PIP TP4 auch aus weiteren Intermediaten, die bei den Messungen nicht entdeckt wurden.

4.1.6 Übersicht der photolytischen Umwandlung von β -Lactam-Antibiotika

Da PIP insgesamt vier TPs mit einer anderen Konstitution als die Ausgangssubstanz hat, ist der photolytische Transformationsweg der β -Lactam-Antibiotika am Beispiel von PIP zusammengefasst und in Abb. 4.1.6 dargestellt.

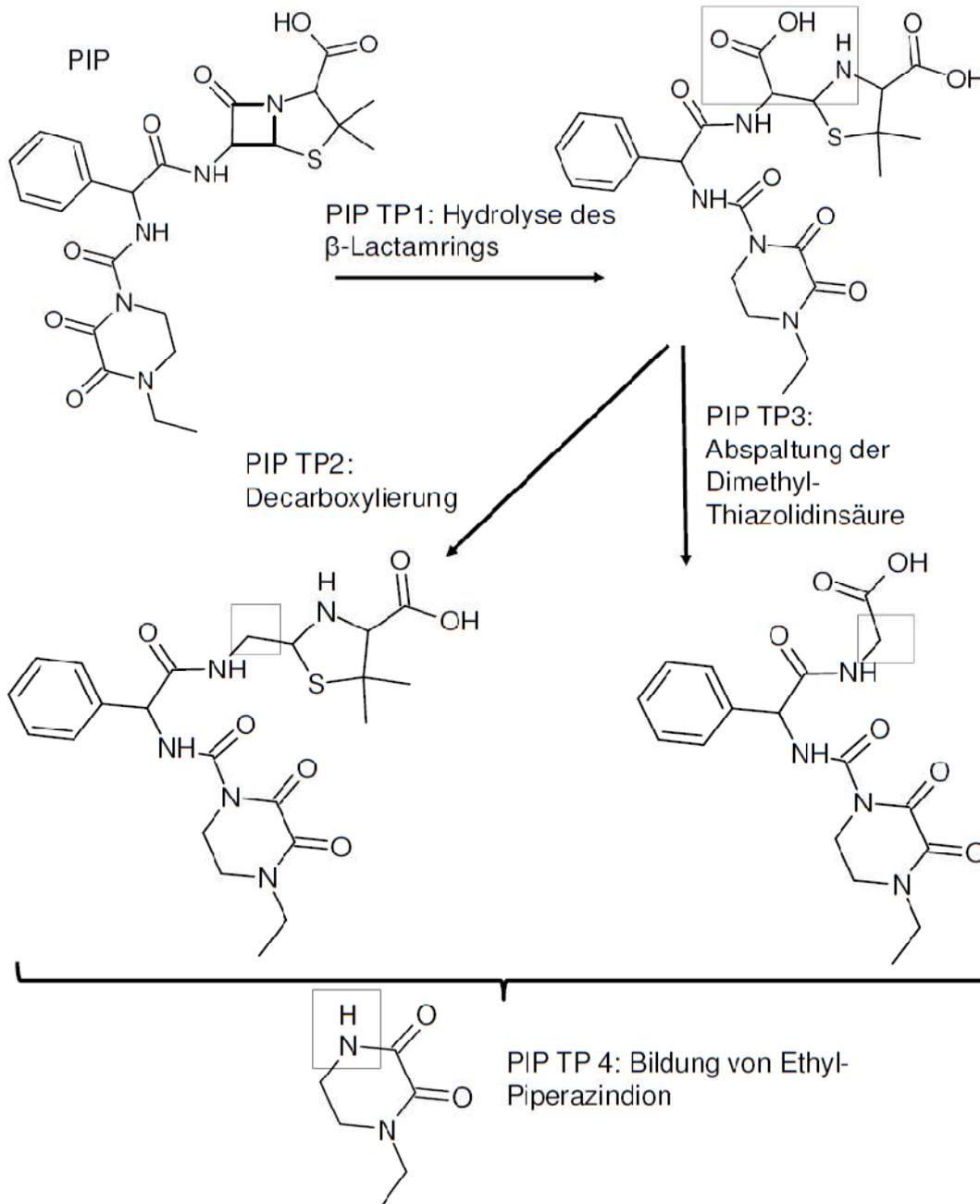


Abb. 4.1.6: Reaktionswege von PIP durch direkte Photolyse.

Abgesehen von der Epimerisierung von PEN, ist die Hydrolyse des β -Lactamrings der primäre Reaktionsweg während der photolytischen Transformation von β -Lactam-Antibiotika. Von hier aus lassen sich für AMP, PEN und PIP zwei unterschiedliche sekundäre

4. Transformationsprodukte

Reaktionen beobachten: Die Decarboxylierung und die Abspaltung von Dimethylthiazolidinsäure. Hirte et al. (2016), Junza et al. (2014) sowie Nägele und Moritz (2005) zeigten für AMX eine weitere Reaktion ausgehend von AMX TP1, bei dem ein Piperazindion-Ring aus der Kondensation zwischen der zuvor entstandenen Carboxygruppe und dem Amin des Aminotoluylrings entsteht.

Diese Reaktion konnte für keine der getesteten Antibiotika nach der Photolyse beobachtet werden. Auch die von Längin et al. (2009) beschriebene hydrolytische Abspaltung von Phenol durch Mikroorganismen konnte in dieser Studie nicht beobachtet werden. Bei AMX kann die geringe Anzahl entdeckter photolytischer TPs dadurch erklärt werden, dass die chromatographische Methode für die Analyse von Molekülen mit einer mittleren Polarität entwickelt wurde. Da die Retentionszeit von AMX bereits sehr kurz war, ist möglich, dass einige TPs von AMX chromatographisch nicht erfasst wurden.

Während die TPs 1 und TPs 2 auch durch Hydrolyse und mikrobiellen Abbau entstehen, kann die Bildung von den TPs 3 als rein photolytische Abbaureaktion von β -Lactam-Antibiotika gesehen werden. Somit lässt sich die Bildung der TPs 3 in Bezug auf umweltchemische Prozesse auf photolytischen Abbau zurückführen, während einige bekannte TPs photolytisch nicht entstanden sind. Damit ergibt sich, dass sich Photolyse von β -Lactam-Antibiotika im Hinblick auf TPs von Hydrolyse und mikrobiellem Abbau deutlich unterscheidet.

Der Abbau von PIP in der aquatischen Umwelt ist bisher nicht so bekannt wie der von AMX, AMP und PEN. Zwar konnte die hydrolytische Ringöffnung des β -Lactamrings von PIP durch Mikroorganismen von Längin et al. (2009) beschrieben werden, jedoch wurden keine Quellen gefunden, die die Bildung von Ethylpiperazindion beschreiben.

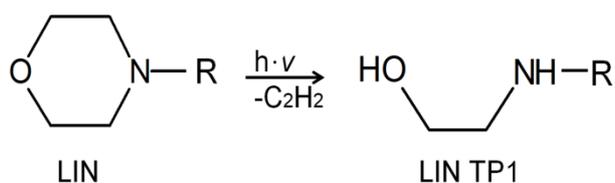
4. Transformationsprodukte

4.2 Photolytische Umwandlung von Linezolid

Unter simuliertem Sonnenlicht bildete LIN insgesamt sieben TPs, von denen nur sechs unter UV₂₅₄-Licht entstanden. Tab. Anhang 5 fasst die Strukturformeln der TPs von LIN zusammen.

4.2.1 Öffnung des Morpholinylrings

Mit m/z 312,1348 (entsprechend $C_{14}H_{19}FN_3O_4^+$) lässt sich bei LIN TP1 erkennen, dass C_2H_2 von LIN abgespalten wurde. Das Hauptfragment der MS^2 -Spektren von LIN TP1 (Abb. Anhang 28-29) liegt bei m/z 270,1308 und kann durch Abspaltung von Acetylen entstanden sein. Im MS^2 -Spektrum zeigt sich, dass alle Fragmente zwischen m/z 60 und 260 den intakten Fluorphenylring und einige den intakten Oxazolidinonring beinhalten. Es lässt sich folgern, dass die Transformation den Morpholinylring betraf. Abb. 4.2.1 zeigt die Öffnung des Morpholinylrings, die zur Bildung von LIN TP1 aus LIN führt.



Die Transformation von LIN zu LIN TP1 wurde bereits in der Literatur beschrieben. Laut Tiwari und Bonde (2012) entsteht LIN TP1 durch Hydrolyse von LIN in basischer bis pH-neutraler Umgebung. Dieses TP wurde nicht in Lösungen gefunden, die mit UV₂₅₄-Licht bestrahlt wurden. Hierfür sind zwei mögliche Ursachen denkbar. Einerseits ist denkbar, dass LIN TP1 nicht photolytisch entsteht und aufgrund der kurzen Versuchsdauer unter UV₂₅₄-Licht nicht entstanden ist, während die Bestrahlungsdauer mit simuliertem Sonnenlicht deutlich länger war und damit den langsamen hydrolytischen Abbau ermöglichte. Andererseits ist möglich, dass LIN TP1 sehr empfindlich auf UV₂₅₄-Licht ist und unmittelbar nach der Entstehung weiterreagiert. Mithilfe eines Referenzstandards könnte diese Frage geklärt werden.

4.2.2 Defluorierung des Phenylrings

LIN TP2 wurde bei m/z 294,1448 (entsprechend $C_{14}H_{20}N_3O_4^+$) entdeckt. Es lässt sich hieraus erkennen, dass das Fluoratom am Phenylring durch Wasserstoff ersetzt wurde. Dies wird durch sieben Fragmente bestätigt, die bei LIN TP1 eine um m/z 17,9906 (entsprechend Fluor) größere Masse haben (Abb. Anhang 30-31). Nur das Fragment bei m/z 56,0495 (entsprechend $C_3H_6N^+$) ist sowohl bei LIN TP1 als auch bei LIN TP2 zu finden. Dies ist das

4. Transformationsprodukte

einziges Fragment, das den Phenylring nicht enthält. Die Struktur von LIN TP2 wurde bereits als photolytisches TP beschrieben (Fasani et al., 2008; Martin et al., 1999). Abb. 4.2.2 zeigt die Reaktion von LIN TP1 zu LIN TP2.

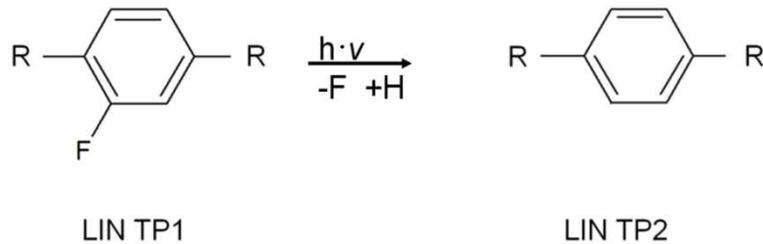


Abb. 4.2.2: Defluorierung des Fluorphenylrings.

Ob Fluor nach der Abspaltung als Fluorwasserstoff vorlag oder weitere Reaktionen mit TPs oder Wasser einging, wurde nicht weiter untersucht. Auch wenn LIN TP1 möglicherweise hydrolytisch statt photolytisch entsteht, ist die darauf folgende Phototransformation zu LIN TP2 bereits von LIN beschrieben (Fasani et al., 2008; Martin et al., 1999).

4.2.3 Substitution von Fluor durch eine Hydroxygruppe

LIN TP3 wurde bei m/z 336,1548 (entsprechend $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_5^+$) entdeckt. Aus der berechneten Summenformel zeigt sich, dass Fluor durch eine Hydroxygruppe ersetzt wurde. Die MS^2 -Spektren von LIN TP3 (Abb. Anhang 32-34) zeigen vier Fragmente, die den Austausch von Fluor durch eine Hydroxygruppe bestätigen. Abb. 4.2.6 zeigt die Reaktion von LIN zu LIN TP3.

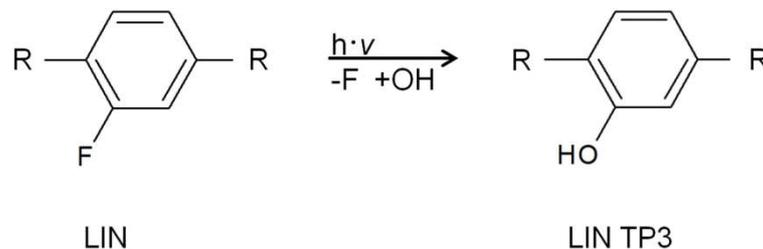


Abb. 4.2.3: Substitution von Fluor durch eine Hydroxygruppe.

Die photolytische Substitution von Fluor durch eine Hydroxygruppe wurde bereits von Fasani et al. (2009) beschrieben. Da Fluor mitverantwortlich für die antibakterielle Aktivität von LIN ist, kann durch die Defluorierung und durch die Substitution von Fluor durch eine Hydroxygruppe eine Verminderung der Wirksamkeit vermutet werden.

4.2.4 Dehydrierung des Morpholinylrings mit Defluorierung

Es wurden zwei Peaks (LIN TP4a bei $t_R = 2,34$ und LIN TP4b bei $2,42$ min) bei m/z 318,1445 (entsprechend $C_{16}H_{20}N_3O_4^+$) entdeckt. Beide Peaks zeigten nahezu identische MS^2 -Spektren (Abb. Anhang 35-36). Bei der Photolyse mit UV_{254} -Licht zeigte sich nur der früher eluierende Peak. LIN und LIN TP4 haben jeweils nur ein Stereozentrum, sodass die Bildung von chromatographisch trennbaren Epimeren nicht die Ausbildung von zwei Peaks erklären kann. Mit der verwendeten Säule sind Epimere wie bei PEN TPa-b nur bei unterschiedlicher Konfiguration trennbar. Möglicherweise könnte die Bildung des zweiten Peaks unter simuliertem Sonnenlicht durch ein weiteres größeres TP erklärt werden, dass während der Ionisierung zu LIN TP4 zerfällt. Letztendlich kann die Bildung des zweiten Peaks jedoch nicht eindeutig geklärt werden.

Aus der berechneten Summenformel lässt sich ableiten, dass ein Fluor- und ein Wasserstoffatom von LIN abgespalten wurden. Wie in 4.2.2, muss bei der Defluorierung die entstehende freie Stelle am Phenylring durch ein Wasserstoffatom oder eine andere funktionelle Gruppe ersetzt werden. Somit kann abgeleitet werden, dass an anderer Stelle im Molekül zwei Wasserstoffatome abgespalten wurden. Der Vergleich des Spektrums von LIN und LIN TP4 (Abb. Anhang 35) zeigt, dass LIN ein Fragment bei 235,1237 (entsprechend $C_{13}H_{16}FN_2O^+$) hat, während LIN TP4 ein Fragment bei 215,1173 (entsprechend $C_{13}H_{15}N_2O^+$) aufweist. Da beide Fragmente durch die Abspaltung des Oxazolidinonrings entstanden sein können, ist die Position der Dehydrierung wahrscheinlich im Morpholinylring. Abb. 4.2.4 zeigt die Reaktion zur Bildung von LIN TP4.

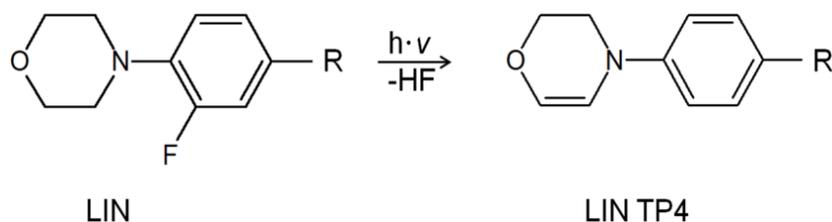


Abb. 4.2.4: Dehydrierung des Morpholinylrings zu einem Dihydroxy-Oxazinring und Defluorierung des Phenylrings.

Auffällig ist, dass die Defluorierung des Phenylrings und die Dehydrierung des Morpholinylrings nicht unabhängig voneinander geschehen. Es wurde kein TP entdeckt, das einen unveränderten Morpholinylring mit einem Phenylring ohne Fluor- oder Hydroxygruppe enthält. Ebenso wurde kein TP gefunden, das einen unveränderten Fluorphenylring mit einem Dihydroxy-Oxazinring beinhaltet. Das kann dadurch erklärt werden, dass während der Dehydrierung ein Wasserstoffatom an das Fluoratom zu Flusssäure und das andere Wasserstoffatom an den Phenylring bindet. Um diese Hypothese zu prüfen, könnte LIN mit einem deuterierten Morpholinylring hilfreich sein. Sollte sich bei der

4. Transformationsprodukte

Photolyse deuterierte Flusssäure und ein deuterierter Phenylring bilden, so würde sich damit die Hypothese bestätigen.

4.2.5 Oxidative Öffnung des Morpholinylrings

Durch die Dehydrierung des Morpholinylrings hat sich bei LIN TP4 eine π -Bindung zwischen zwei Kohlenstoffatomen gebildet, die in einem weiteren Schritt oxidativ gespalten wurde. Aus der berechneten Summenformel von LIN TP5 bei m/z 350,1341 (entsprechend $C_{16}H_{20}N_3O_6^+$) ergibt sich eine Zunahme von zwei Sauerstoffatomen. Entsprechend der Auswertung der MS^2 -Spektren (Abb. Anhang 37-38) lässt sich schließen, dass die π -Bindung des Dihydroxy-Oxazinrings zu einem Di-aldehyd oxidiert wurde.

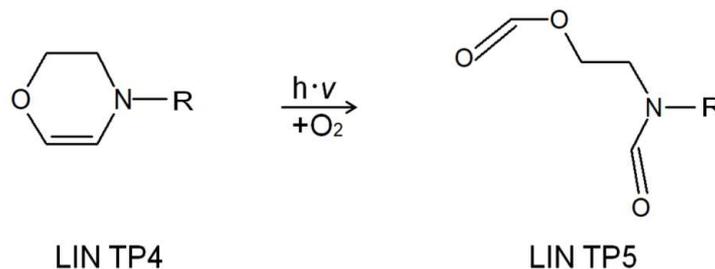


Abb. 4.2.5: Oxidative Öffnung des Dihydroxy-Oxazinrings.

Derartige Oxidationsprodukte von Alkenen wurden bereits bei der Oxidation mit Ozon beschrieben (Harries et al., 1905; Rubin et al., 2003). Ob im Wasser gelöster Sauerstoff photolytisch zu reaktiven Sauerstoffspezies umgewandelt wurde, ist nicht näher untersucht worden. Bekannt ist, dass UV-Strahlung Sauerstoff zu reaktiven Sauerstoffspezies anregen kann (de Jager et al., 2017). Die photolytische Reaktivität von Alkenen kann weiterhin mit der höheren Strahlungsabsorption durch die π -Elektronen erklärt werden. Auch von Fasani et al. (2008) und Martin et al. (1999) konnte LIN TP5 als photolytisches TP von LIN entschlüsselt werden.

4.2.6 Decarbonylierung

Aus LIN TP5 entstand ein tertiäres TP mit einer um m/z 27,9949 niedrigeren Masse. Da der Massenverlust einer Abspaltung von einem Kohlenstoff- und einem Sauerstoffatom entspricht, kann hieraus eine Decarbonylierung angenommen werden. In den MS^2 -Spektren von LIN TP4 und LIN TP5 konnte ein Fragment bei m/z 304,1288 (entsprechend $C_{15}H_{18}N_3O_4^+$) entdeckt werden, das aus einer Fragmentierung der Ethyl-formiat-esthergruppe entstehen kann. Daher ist anzunehmen, dass an dieser Position Kohlenmonoxid abgespalten wurde. Dies lässt sich auch daran erkennen, dass das MS^2 -Spektrum LIN TP6 (Abb. Anhang 39) ein Fragment bei m/z 280,1287 (entsprechend $C_{13}H_{18}N_3O_4^+$) zeigt, während dieses Fragment von LIN TP5 bei m/z 308,1235 liegt und damit um die Masse von Kohlenmonoxid schwerer ist. Dieses Fragment wird einer Decarboxylierung der

4. Transformationsprodukte

Aminogruppe am Oxazolidinonring zugeordnet. Abb. 4.2.6 zeigt die Reaktion von LIN TP5 zu LIN TP6.

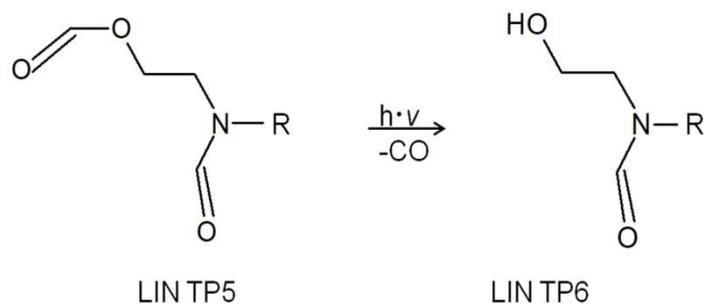


Abb. 4.2.6: Decarbonylierung.

LIN TP5 wurde bereits als photolytisches TP von LIN beschrieben (Fasani et al., 2008; Martin et al., 1999).

4.2.7 Abspaltung des Oxazolidinonrings

Das kleinste entdeckte TP wurde bei m/z 159,0761 (entsprechend $C_6H_{11}N_2O_3^+$) gefunden. Die berechnete Summenformel entspricht einem Bindungsbruch zwischen dem Phenylring und dem Oxazolidinonring, wobei der Oxazolidinonring als TP erhalten bleibt. Dies bestätigt sich dadurch, dass keines der Fragmente von LIN oder LIN TP1-6, die dem Morpholinylring und/oder dem Phenylring zugeordnet wurden, in dem MS^2 -Spektrum von LIN TP7 (Abb. Anhang 41) enthalten ist. LIN TP7-D3 (Abb. Anhang 42) lag entsprechend bei m/z 162,0955. Abb. 4.2.7 zeigt die Abspaltung des Oxazolidinonrings.

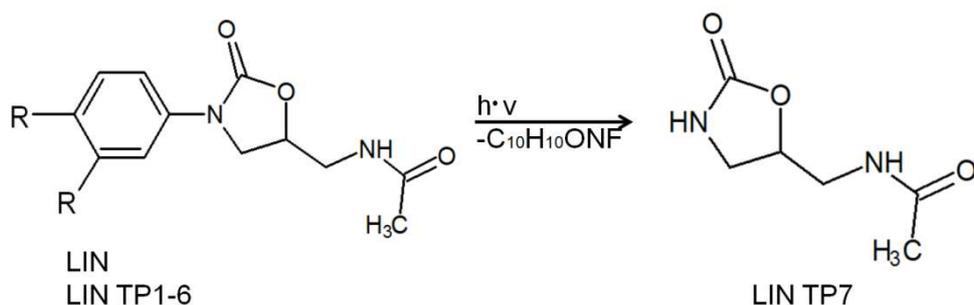


Abb. 4.2.7: Abspaltung des Oxazolidinonrings zu LIN TP7.

Im Gegensatz zu LIN TP1-6 kann bei LIN TP7 nicht bestimmt werden, ob es ein primäres, sekundäres, tertiäres oder quartäres TP ist. Hierzu wären Referenzstandards aller TPs notwendig. Wahrscheinlich kann LIN TP7 aus LIN und mehreren oder auch aus allen beschriebenen TPs entstehen.

4.2.8 Übersicht der photolytischen Umwandlung von Linezolid

Abb. 4.2.8 fasst die beschriebenen Transformationswege von LIN zusammen. Die photolytischen Reaktionen betreffen ausschließlich den Morpholinylring und den Fluorphenylring. Alle TPs zeigen einen unveränderten Oxazolidinonring.

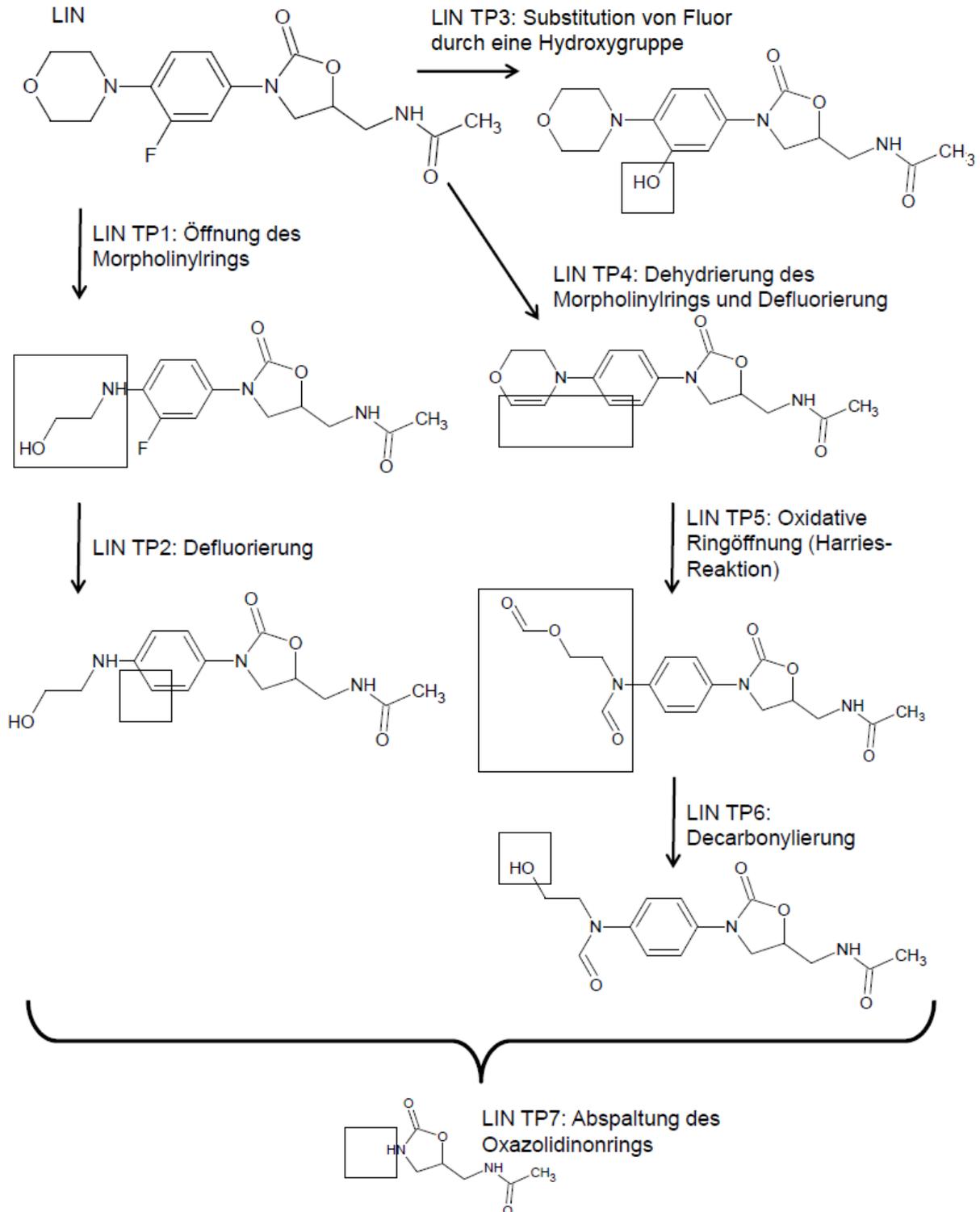


Abb. 4.2.8a: Reaktionswege des Abbaus von LIN durch direkte Photolyse.

4. Transformationsprodukte

Um die Entstehung und den Abbau der einzelnen TPs ohne Referenzstandard über die Bestrahlungsdauer nachzuverfolgen, wurden die Peakflächen als Konzentrationsäquivalente gegen die Bestrahlungsdauer aufgetragen. Ohne Referenzstandards ist die Bestimmung der absoluten Konzentrationen nicht möglich. Die Peakflächen ermöglichen, die Konzentrationen der einzelnen TPs in den jeweiligen Proben zu vergleichen, ohne die absoluten Konzentrationen zu bestimmen. Das Verhältnis zwischen den verschiedenen TPs kann daraus nicht bestimmt werden. Somit kann hieraus nicht abgeleitet werden, welche TPs bevorzugt gebildet werden. Abb. 4.2.8b zeigt, wie sich die relativen Konzentrationen von LIN und LIN TP1-7 während der Bestrahlung verhalten.

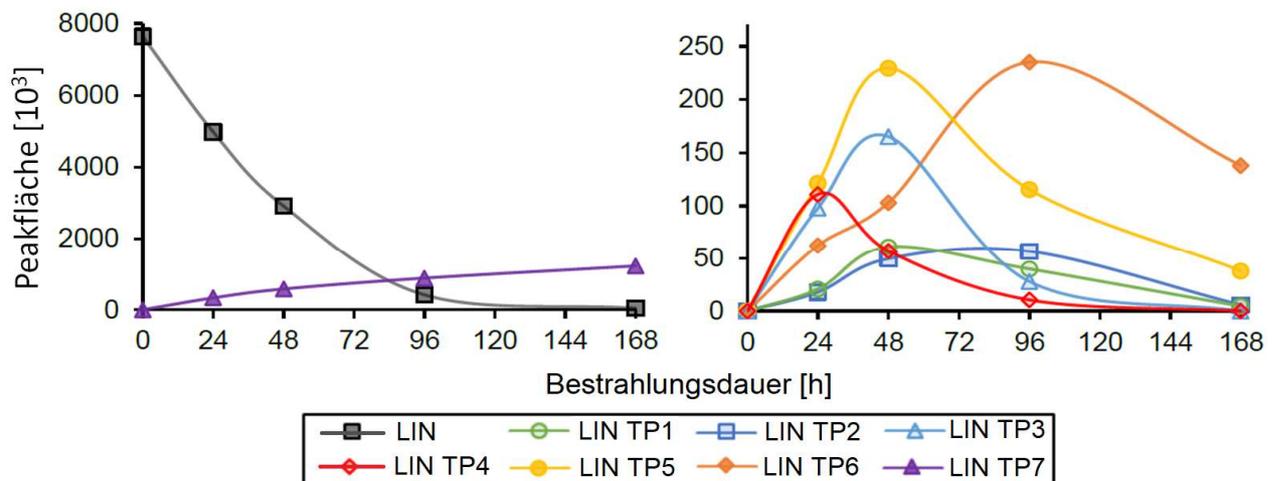


Abb. 4.2.8b: Peakflächen von LIN und LIN TP1-7 in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer.

Bereits nach 24 h Bestrahlung waren alle sieben TPs nachweisbar. Die Konzentrationen von LIN TP1-6 nahmen bei Beginn der Strahlung zu und erreichten nach unterschiedlicher Bestrahlungsdauer ein Maximum. Es ist erkennbar, dass die Bestrahlungsdauer bis zur maximalen Peakfläche eines TP mit der jeweiligen Transformationsstufe korreliert. Primäre TPs bildeten sich früher, gefolgt von sekundären und tertiären TPs. So erreichte das primäre LIN TP4 nach 24 h das Konzentrationsmaximum, das sekundäre LIN TP5 nach 48 h, das tertiäre LIN TP6 nach 96 h und die Konzentration des finalen LIN TP7 stieg durchgehend über die ganze Versuchsdauer an. Dies bestätigt die Richtigkeit der beschriebenen Reihenfolge der TPs innerhalb der Transformationswege. Damit kann gezeigt werden, dass neben LIN auch LIN TP1-6 durch simuliertes Sonnenlicht abbaubar sind. LIN TP7 zeigte weder unter simuliertem Sonnenlicht noch unter UV₂₅₄-Licht einen Rückgang der Konzentration. Gegebenenfalls ist LIN TP7 nicht oder nur extrem langsam photolytisch abbaubar.

4.3. Photolytische Umwandlung von Tedizolid

Die Untersuchung der photolytischen TPs von TED zeigte sechs TPs, wobei zwei TPs die gleiche Masse und ähnliche MS²-Spektren zeigten. Die Bestrahlung mit UV₂₅₄-Licht führte zur Bildung von nur zwei der sechs TPs.

4.3.1 Oxidation des Pyridinylrings

Nach der Bestrahlung durch simuliertes Sonnenlicht zeigten sich bei m/z 387,1213 (entsprechend C₁₇H₁₆FN₆O₄⁺) zwei Peaks (TED TP1a bei t_R = 3,09 min und TED TP1b bei 3,35 min). Unter UV₂₅₄-Licht entstand nur TED TP1b. Beide TPs zeigten sehr ähnliche MS²-Spektren (Abb. Anhang 45-46), sodass von einer ähnlichen Struktur ausgegangen werden kann. Nur ein Fragment bei m/z 269,0833 entstand bei TED TP1b, aber nicht bei TED TP1a. Die Auswertung der MS²-Spektren zeigte, dass der Pyridinylring oxidiert wurde, wobei aus den MS²-Spektren die Position des Sauerstoffatoms nicht eindeutig geklärt werden kann. Abb. 4.3.1 zeigt die Reaktion von TED zu TED TP1.

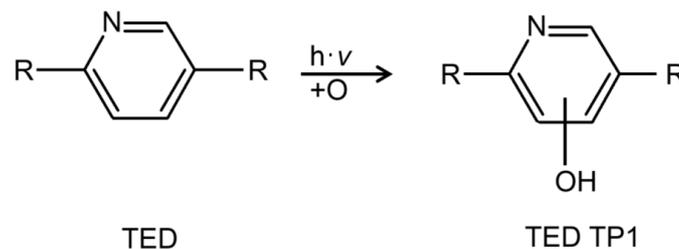


Abb. 4.3.1: Oxidation des Pyridinylrings.

Möglich ist, dass das Amin zu einem Hydroxyamin oxidiert wird. Andererseits kann die Hydroxygruppe an eines der drei Kohlenstoffatome binden. Die beiden Peaks von TED TP1 können durch eine Oxidation an zwei Positionen entstanden sein. Die Position der Oxidation könnte durch Referenzstandards oder mittels NMR geklärt werden. Für eine NMR-Analyse müsste TED TP1 in angemessener Reinheit aufkonzentriert werden. Lei et al. (2017) beschrieben ein TP von TED, dass an der Aminogruppe des Pyridinylrings oxidiert wurde. In dieser Publikation wurde jedoch nicht eindeutig geklärt, warum diese Position für die Oxidation vorgeschlagen wurde. Andere Methoden zur Strukturaufklärung als LC-HR-MS/MS wurden dabei nicht verwendet.

4. Transformationsprodukte

4.3.2 Oxidation des Oxazolidinonrings

TED TP1 reagierte weiter zu TED TP2, das bei m/z 403,1160 (entsprechend $C_{17}H_{16}FN_6O_5^+$) eine weitere Oxidation aufzeigt. Aus den Fragmenten (Abb. Anhang 47-48) bei m/z 320,0809 und 375,1093 kann geschlossen werden, dass das zusätzliche Sauerstoffatom am Oxazolidinonring gebunden ist. Die fünf weiteren Fragmente lassen über die berechneten Summenformeln ebenfalls auf einen oxidierten Oxazolidinonring schließen. Abb. 4.3.3 zeigt die Oxidation des Oxazolidinonrings.

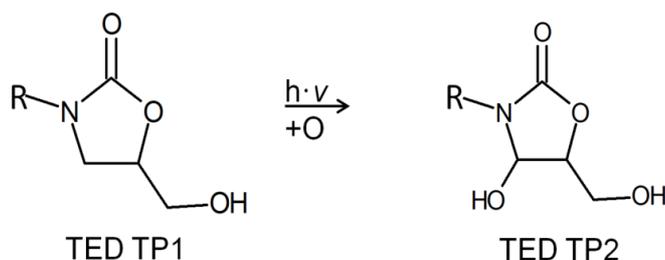


Abb. 4.3.2: Oxidation des Oxazolidinonrings zu TED TP2.

Die Bildung von TED TP2 wurde nicht unter UV_{254} -Licht beobachtet. Möglich ist, dass TED TP2 nicht unter dieser Strahlungsquelle entsteht, oder dass UV_{254} -Licht zur sofortigen Umwandlung von TED TP2 führt. Es wurden jedoch keine TPs gefunden, die aus TED TP2 entstanden sein können.

4.3.3 Substitution von Fluor durch eine Hydroxygruppe

Ähnlich wie bei LIN TP3, zeigte TED TP3 bei m/z 369,1306 (entsprechend $C_{17}H_{17}N_6O_4^+$) eine um m/z 3,0035 höhere Masse als die unbestrahlte Substanz. Aus der Massendifferenz lässt sich berechnen, dass Fluor durch eine Hydroxygruppe ersetzt wurde. Dies wird durch sieben Fragmente im MS^2 -Spektrum (Abb. Anhang 49-50) bestätigt, die dieselbe Massendifferenz zum jeweiligen Fragment von TED zeigen und dem Phenylring zugeordnet werden konnten. Abb. 4.3.3 zeigt die Reaktion von TED zu TED TP3.

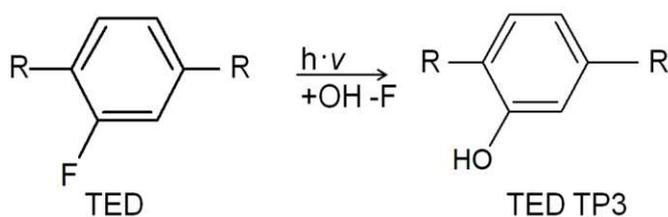


Abb. 4.3.3: Substitution von Fluor durch eine Hydroxylgruppe am Phenylring.

TED TP3 ist das einzige TP von TED, das ein Analogon zum äquivalenten LIN TP3 ist. Bei beiden Antibiotika ist denkbar, dass die Wirkung von LIN und TED ohne Fluor gemindert wird.

4. Transformationsprodukte

4.3.4 Abspaltung des Oxazolidinonrings

Bei TED TP4 konnte mit m/z 271,1100 eine Massendifferenz von m/z 100,0158 zu TED berechnet werden, die einer Abspaltung des Oxazolidinonrings entspricht. TED TP4 zeigte weiterhin nicht die Fragmente (Abb. Anhang 51) bei m/z 343,1195, 316,1084, 314,0932 und 288,0900, die im Spektrum von TED dem Oxazolidinonring zugeordnet werden konnten. Abb. 4.3.4 zeigt die Abspaltung des Oxazolidinonrings zu TED TP4.

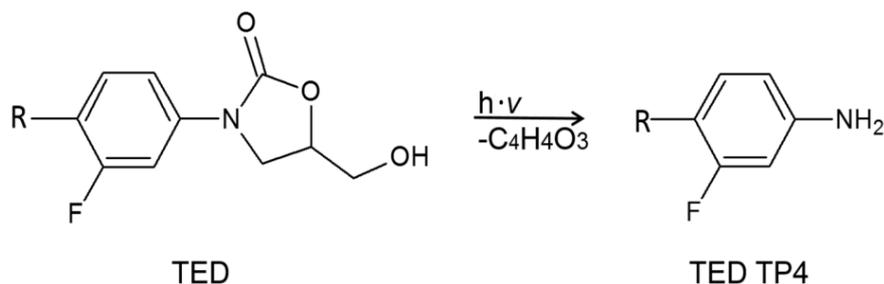


Abb. 4.3.4: Abspaltung des Oxazolidinonrings zu TED TP4.

Der photolytische Abspaltung des Oxazolidinonring wurde bereits bei LIN TP7 beschrieben, jedoch mit deutlichen Unterschieden. Während bei LIN TP7 der Oxazolidinonring intakt bleibt, wird der Oxazolidinonring bei TED TP4 zerstört. Nur das Stickstoffatom des Oxazolidinonrings bleibt bei TED TP4.

4.3.5 Abspaltung des Pyridinylrings

TED TP5 wurde bei m/z 206,0673 (entsprechend $C_8H_8N_5O_2^+$) entdeckt. Die berechnete Summenformel entspricht einen Bindungsbruch zwischen dem Pyridinylring und dem Phenylring, wobei der Phenylring durch eine Carboxygruppe ersetzt ist. Dieser Bindungsbruch bestätigt sich mit dem MS^2 -Spektrum (Abb. Anhang 53-55). Keines der Fragmente von TED und TED TP1-4, die dem Oxazolidinonring und/ oder dem Phenylring zugeordnet werden konnten, lässt sich im MS^2 -Spektrum von TED TP5 wiederfinden. Abb. 4.3.5 zeigt die Reaktion der Bildung von TED TP5.

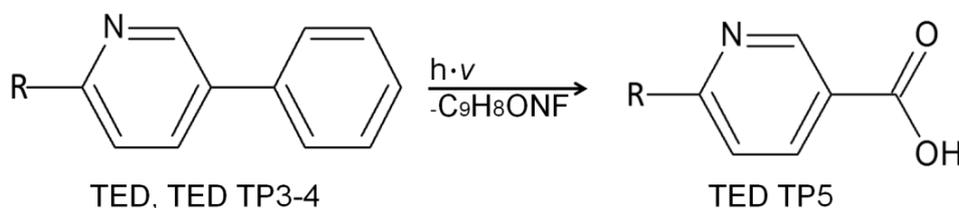


Abb. 4.3.5: Bildung von TED TP5.

TED TP5 kann sowohl aus TED als auch aus TED TP3-4 entstehen. Ob alle drei Substanzen photolytisch in TED TP5 umgewandelt werden können, könnte durch photolytische Abbauexperimente mit Referenzstandards geklärt werden.

4.3.6 Übersicht der photolytischen Umwandlung von Tedizolid

Abb. 4.3.6a fasst die Transformationswege von TED zusammen.

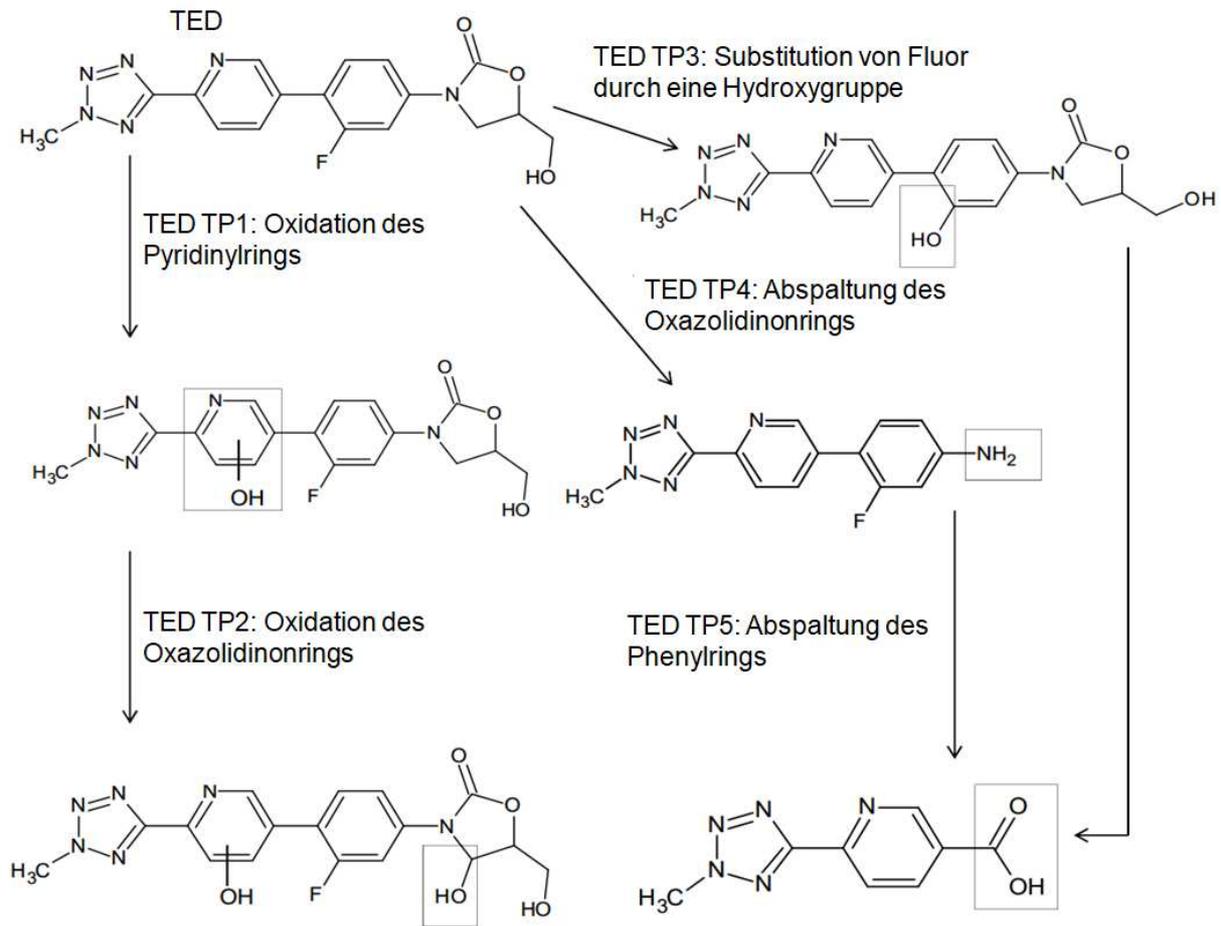


Abb. 4.3.6a: Reaktionswege des Abbaus von TED durch direkte Photolyse.

TED TP1-5 lassen erkennen, dass bei diesem Antibiotikum überwiegend der Oxazolidinonring photolytisch umgewandelt wird. Nur zwei der fünf TPs zeigen einen unveränderten Oxazolidinonring. Die Substitution von Fluor durch eine Hydroxygruppe ist die einzige Reaktion, die bei LIN und TED gleich verläuft. Warum TED und TED TP1-5 nicht wie bei LIN TP2 und LIN TP4 defluorieren, ist unklar. Die Substitution von Fluor durch die Hydroxygruppe wurde nicht bei TED TP1-2 und TED TP4 beobachtet. Ebenso wurden keine von TED TP3 abgeleiteten TP mit transformiertem Oxazolidinonring entdeckt. Abb. 4.3.6b zeigt die Peakflächen der einzelnen TPs als Konzentrationsäquivalente gegen die Bestrahlungsdauer aufgetragen.

4. Transformationsprodukte

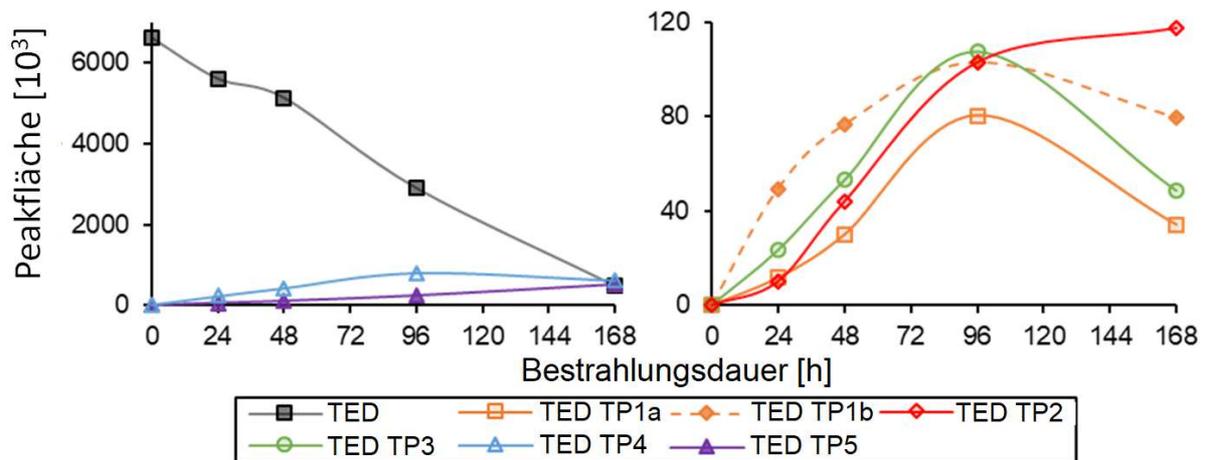


Abb. 4.3.6b: Peakflächen von TED und TED TP1-5 in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer.

Es lässt sich erkennen, dass sich während der Bestrahlungsdauer die primären TPs TED TP1 und TED TP3 bis zu einer Maximalkonzentration nach 96 h bilden, während die Konzentrationen von TED TP4 und der sekundären TED TP2a-b und TED TP5 bis nach 168 h stetig ansteigen. Dies bestätigt, dass TED TP1 und 3 als primäre Intermediate weiterreagieren. Ähnlich wie LIN TP7, steigt auch die Konzentration von TED TP5 durchgehend an. Daher ist möglich, dass TED TP5 photolytisch stabil ist.

5. Wirkung photolytisch abgebauter Antibiotika

Wie in 2.6 (Seite 33) beschrieben, wurde die Toxizität der bestrahlten Lösungen mit zwei verschiedenen Bakterientests untersucht. Der Test an *Bacillus subtilis* bestimmt, wie stark das Wachstum dieses ubiquitären Umweltbakteriums gehemmt wird. Damit soll bestimmt werden, ob photolytisch entstandene TPs eine bakterizide Restwirkung besitzen.

Der Test an *Aliivibrio fischeri* bestimmt, wie stark die metabolische und enzymatische Aktivität dieses Bakteriums gehemmt wird. Dieses Bakterium synthetisiert Luciferin und das Enzym Luciferase, das Luciferin zu Oxyluciferin oxidiert, wobei Licht einer Wellenlänge von 490 nm emittiert wird (Madigan et al., 2012; Mitchell und Gu, 2010; Wiley et al., 2009). Wird dieser biochemische Prozess verhindert, indem beispielsweise die Biosynthese von Luciferase oder Luciferin blockiert oder eine der Substanzen durch Schadstoffe zerstört wird, so kann man die toxische Wirkung der Schadstoffe als Hemmung des Leuchtens quantifizieren. Eine Verminderung der Biolumineszenz zeigt die akute Wirkung auf die für die Lumineszenz verantwortlichen biochemischen Reaktionen, lässt aber nicht auf eine bakterizide oder wachstumshemmende Wirkung rückschließen.

5.1.Toxizität der β -Lactam-Antibiotika

Die MHKs von PEN liegen zwischen 0,25 und 2 mg/L für die meisten pathogenen Bakterien (Blenheim Pharmacal, 2015). Da keine MHK-Werte für *Bacillus subtilis* vorlagen, wurden diese vor dem Experiment bestimmt. Die Bestimmung der MHKs mittels Hemmhoftest an *Bacillus subtilis* ergab 0,5 mg/L für AMX, AMP und PEN sowie 2 mg/L für PIP.

5. Wirkung

5.1.1 Wachstumshemmung von *Bacillus subtilis*

In Abb. 5.1 ist die Wachstumshemmung von *Bacillus subtilis* in einem mit β -Lactam-Antibiotika versetzten Nährmedium nach 8 h Inkubation dargestellt.

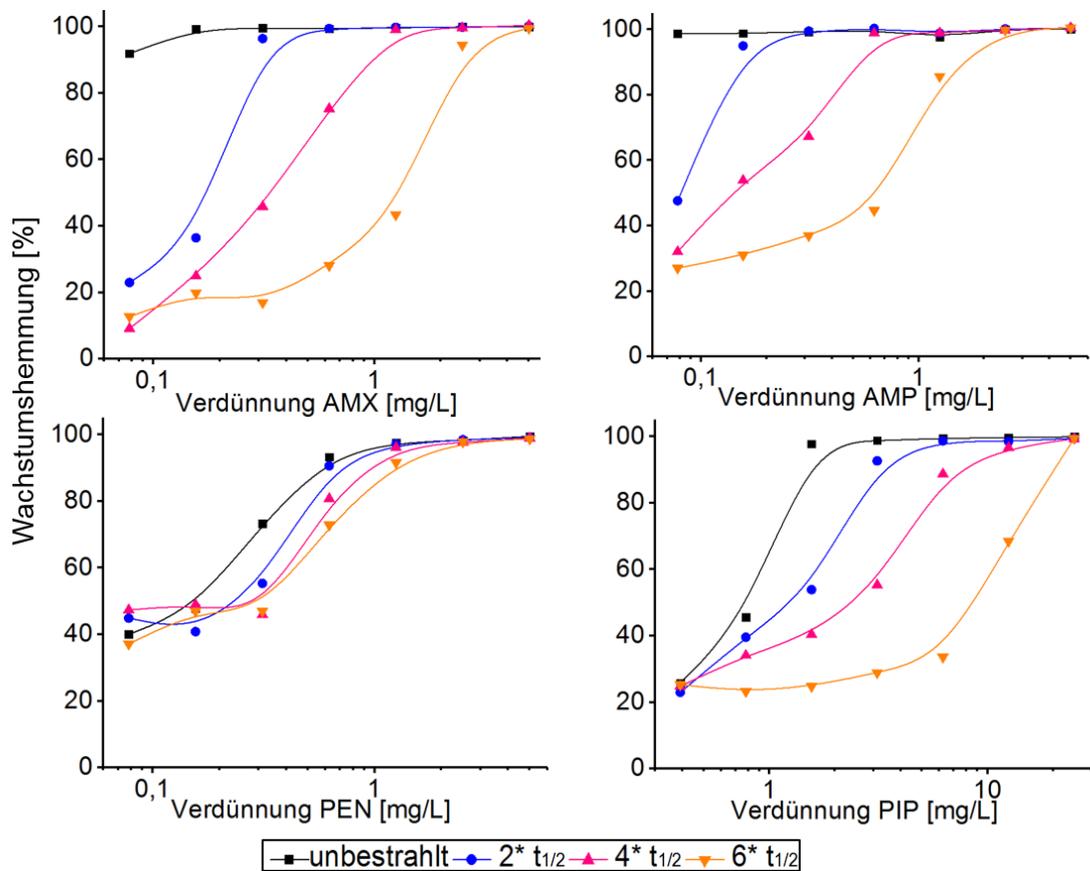


Abb. 5.1.1: Wachstumshemmung durch UV₂₅₄-bestrahlte β -Lactam-Antibiotika an *Bacillus subtilis* innerhalb von 8 h in Nährmedium, n=3, Standardabweichung <30%.

Bei AMX, AMP und PIP nahm die Wachstumshemmung der Bakterien mit zunehmender Bestrahlungsdauer der Antibiotika ab. AMX und AMP zeigten vor der Bestrahlung selbst mit einer Konzentration von 0,08 mg/L eine Wachstumshemmung von über 90%, während nach der ersten Bestrahlung nur noch jeweils 23% und 44% Wachstumshemmung mit derselben Verdünnungsstufe erreicht wurden. PIP zeigte erst bei 1,6 mg/L eine Wachstumshemmung über 90%. Nach jeder Bestrahlungseinheit sinkt die Wachstumshemmung kontinuierlich bis auf 25%. Daraus lässt sich folgern, dass Photolyse zur Senkung der antibakteriellen Aktivität von AMX, AMP und PIP beiträgt.

Der Zusammenhang zwischen Bestrahlung der Antibiotika und der resultierenden Wachstumshemmung unterscheidet sich bei PEN deutlich von den anderen β -Lactam-Antibiotika. Bei PEN liegen die Hemmkurven der unbestrahlten und bestrahlten Proben deutlich enger beisammen. Die niedrigste Konzentration mit einer Wachstumshemmung über 90% liegt bei 0,63 mg/L unbestrahltem PEN. Die erste Bestrahlung mindert die

5. Wirkung

Wachstumshemmung jedoch nur um 2%. Dem gegenüber sinkt die Wachstumshemmung bei einer entsprechenden Verdünnung von 0,63 mg/L auf 0,16 mg/L um 45%.

Es ergibt sich, dass PEN selbst nach der Bestrahlung um die sechsfache Halbwertszeit eine nur wenig verminderte Wachstumshemmung zeigt. Damit ist Photolyse kaum geeignet, um die antibakterielle Wirkung von PEN aufzuheben. Der Grund hierfür kann in den TPs gefunden werden, die in 4.1.1 beschrieben wurden. Das bakterizide Zentrum, der β -Lactamring, wurde bei den Epimeren PEN TPa-b nicht verändert. Somit kann die bakterizide Wirkung von PEN nach der Bestrahlung durch die Bildung von Epimeren erklärt werden. Dem gegenüber kann die Minderung der Wachstumshemmung von AMP, AMX und PIP nach der Bestrahlung durch die Öffnung des β -Lactamrings erklärt werden, wodurch die TPs nicht mehr antibakteriell wirken.

Zwar wurden bei PEN ebenfalls TPs mit geöffneten β -Lactamring gefunden, jedoch wurden diese nicht quantitativ bestimmt. Die geringe Abnahme der Wachstumshemmung von PEN kann ebenso wie bei AMX, AMP und PIP durch die Öffnung des β -Lactamrings zu PEN TP1-3 erklärt werden kann. Um zu prüfen, ob und wie stark PEN TPa-b bakterizid wirksam sind, wären Referenzsubstanzen der Epimere notwendig. Dass die Ringöffnung des β -Lactamrings zu einem Verlust der bakteriziden Wirkung führt, konnte durch Toxizitätstests mit den Referenzstandards PEN TP1, AMP TP3 und PIP TP4 bestätigt werden. Keine dieser Substanzen zeigte eine Hemmung des Wachstums der Bakterien (Tabelle Anhang 5.1).

Über den Zusammenhang zwischen den Stereozentren von β -Lactam-Antibiotika und deren Wirkung wurden keine Informationen in der Literatur gefunden.

5.1.2 Leuchthemmung von *Aliivibrio fischeri*

Der Toxizitätstest an *Aliivibrio fischeri* nach DIN EN ISO 11348 zeigte keine giftige Wirkung von unbestrahlten oder bestrahlten β -Lactam-Antibiotika (Leuchthemmung <30%; Anhang Tabelle 5.1). β -Lactam-Antibiotika blockieren die Synthese von Peptidoglycan und können Bakterien daher während der Zellteilung töten. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die der Biolumineszenz zugrundeliegenden biochemischen Prozesse. Da unter den Testbedingungen ohne Zugabe von Nährstoffen keine Zellteilung zu erwarten ist, liegt nahe, dass β -Lactam-Antibiotika keine Wirkung in diesem Test zeigen.

AMP TP3, PEN TP1 und PIP TP4 zeigten ebenfalls keine hemmende Wirkung auf das Leuchten der Bakterien. Damit zeigt sich, dass die akute Wirkung dieser TPs auf die aquatische Umwelt nach DIN EN ISO 11348 als ungiftig einzustufen ist.

Trovó et al. (2011) untersuchten die Toxizität von AMX (50 mg/L) vor und nach photo-Fenton-Prozessen mit Eisensulfat. Dabei zeigte sich eine Leuchthemmung an *Aliivibrio fischeri* zwischen 20 und 40% (mindergiftig) ohne Trend zwischen Hemmwirkung und Prozessdauer. Aus der Studie ging jedoch nicht hervor, ob die leuchthemmende

5. Wirkung

Wirkung durch β -Lactam-Antibiotika und deren TPs oder durch Eisensulfat resultierte. Letztlich lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass in diesem Test sowohl von β -Lactam-Antibiotika als auch von deren photolytischen TPs keine akute Giftigkeit für die aquatische Umwelt gezeigt werden konnte. Gmurek et al. (2015) entwickelten einen erweiterten Test, mit dem die Wachstumshemmung von *Aliivibrio fischeri* über einen Zeitraum von 24 h dokumentiert werden kann. Dieser Test unterscheidet sich jedoch deutlich von der DIN-standardisierten Methode. Da die Messung der Lumineszenzhemmung von *Aliivibrio fischeri* nur einen kleinen Aspekt der Toxikologie umfasst, kann im Umkehrschluss nicht pauschal geschlossen werden, dass diese Substanzen ungefährlich für die aquatische Umwelt sind. Für eine fundierte und detaillierte toxikologische Betrachtung wäre weiterhin zu prüfen, welche Effekte durch diese Substanzen in längeren Zeitabschnitten auftreten und ob Eukaryoten wie beispielsweise Wasserflöhe geschädigt werden.

5.2 Toxizität der Oxazolidinon-Antibiotika

Die Wirkung der Oxazolidinon-Antibiotika unterscheidet sich auf biochemischer Ebene maßgeblich von β -Lactam-Antibiotika. Die MHKs an *Bacillus subtilis* wurden über den Microtiterest bestimmt und ergaben je 0,5 mg/L für LIN und TED.

5.2.1 Wachstumshemmung von *Bacillus subtilis*

Die Wachstumshemmung der Oxazolidinon-Antibiotika blieb nach 8 h konstant und zeigte selbst nach 7 Tagen Inkubation kein weiteres Wachstum durch möglicherweise resistente Bakterien. Entsprechend konnte die Wachstumshemmung der jeweiligen Proben mit einer deutlich höheren Präzision bestimmt werden (Standardabweichung <5%). Da die Antibiotikallösungen mit UV₂₅₄-Licht statt mit simuliertem Sonnenlicht bestrahlt wurden, enthielten die bestrahlten Lösungen nicht alle TPs, die unter simuliertem Sonnenlicht entstanden. Bei LIN fehlte LIN TP1 und bei TED fehlten TED TP2 und TED TP4-5. Somit konnte nur die Wirkung von Lösungen mit LIN TP2-7 sowie mit TED TP1 und TED TP3 bestimmt werden. Es wurden in diesen Lösungen keine weiteren TPs entdeckt, die nicht unter simuliertem Sonnenlicht entstanden. Abb. 5.2.1 zeigt die Wachstumshemmung an *Bacillus subtilis* durch bestrahlte Oxazolidinon-Antibiotika.

5. Wirkung

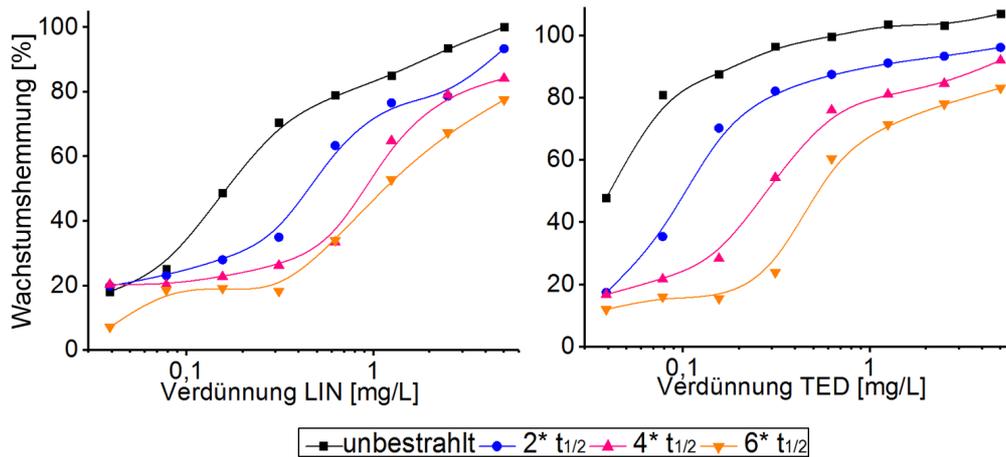


Abb. 5.2.1: Wachstumshemmung durch UV₂₅₄-bestrahlte Oxazolidinon-Antibiotika an *Bacillus subtilis* innerhalb von 8 h in Nährmedium, n=3, Standardabweichung <5%.

Es lässt sich erkennen, dass Photolyse bei LIN und TED zu einer Abnahme der antibakteriellen Wirkung führt, da die Wachstumshemmung der jeweiligen Verdünnungsstufen mit jeder Bestrahlungseinheit niedriger ausfällt.

Ob die bestrahlten Lösungen eine stärkere antibakterielle Wirkung haben als eine jeweilige Verdünnung, kann durch den Vergleich der Verdünnungsstufen erschlossen werden. Bei einer vollständigen Minderung der Hemmwirkung durch Photolyse wäre die Hemmung einer Verdünnung einer unbestrahlten Probe ähnlich wie die Verdünnungsstufe der bestrahlten Probe, die der Antibiotikakonzentration der unbestrahlten Probe entspricht. Beispielsweise mindern 0,16 mg/L unbestrahltes LIN das Wachstum der Bakterien um 46%. Sofern keine wachstumshemmenden TPs gebildet wurden, müssten 0,63 mg/L LIN nach der ersten Bestrahlung eine ähnliche Wirkung auf das Wachstum zeigen. Stattdessen wurden jedoch 55% Wachstumshemmung gemessen und bei 2,5 mg/L LIN nach der Bestrahlung mit der vierfachen Halbwertszeit sogar 68%. Dadurch lässt sich schließen, dass die Bestrahlung von LIN nicht zu einer vollständigen Aufhebung der antibakteriellen Wirkung führt.

Bei TED liegen die Werte mit den beschriebenen Konzentrationen und Bestrahlungsdauern bei jeweils 74, 74 und 72% und damit eng beieinander.

Daher lässt sich folgern, dass die Photolyse die wachstumshemmende Wirkung von TED vollständig aufhebt, bei LIN jedoch nicht. Leider waren Referenzstandards der TPs von LIN nicht verfügbar, sodass die antibakteriell wirksamen TPs nicht genau ermittelt werden konnten. Die Photolyse von LIN führte zur Bildung zahlreicher einiger Oxazolidinon-Derivate, die die verbleibende Wirkung der bestrahlten Antibiotika erklären können. Die Bestimmung der Wachstumshemmung der einzelnen TPs könnte klären, welche Reaktionen zu einer Abnahme oder einem Verlust der antibakteriellen Wirkung führen.

TED zeigte zwei primäre TPs, die einen unveränderten Oxazolidinonring beinhalteten und ein primäres und zwei sekundäre TPs ohne intakten Oxazolidinonring. Alle primären TPs

5. Wirkung

fürten zur Bildung der beiden sekundären TPs, die keinen oder einen veränderten Oxazolidinonring beinhalten. In den mit UV₂₅₄-bestrahlten Lösungen ließen sich jedoch nur die primären TED TP1 und TP3 finden. Dass die Bestrahlung von TED keine über die Restkonzentration hinausgehende Wachstumshemmung zeigt, kann darauf hindeuten, dass TED TP1 und TED TP3 trotz Oxazolidinonring nicht antibakteriell wirken. Um dies zu untersuchen, wären Referenzstandards der fünf TPs notwendig, um diese während der Bestrahlung quantitativ zu bestimmen.

5.2.2 Leuchthemmung an *Aliivibrio fischeri*

Im Gegensatz zu den β -Lactam-Antibiotika zeigen LIN und TED eine giftige Wirkung (Leuchthemmung jeweils 49 und 46%) auf *Aliivibrio fischeri*. Oxazolidinon-Antibiotika verhindern die ribosomale Proteinsynthese und somit auch die Synthese der Luciferase. Daher kann die verminderte Lumineszenz dadurch erklärt werden, dass Luciferin nicht mehr zu Oxyluciferin oxidiert werden kann. Die Hemmung des Leuchtens ist in Abb. 5.2.2 gegen die Bestrahlungsdauer der Antibiotika aufgetragen.

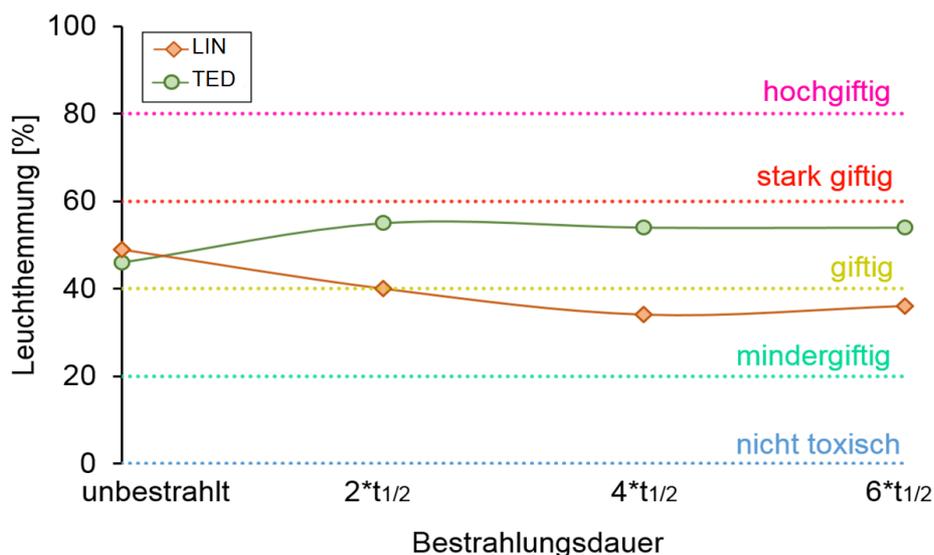


Abb. 5.2.2: Leuchthemmung durch UV₂₅₄-bestrahlte Oxazolidinon-Antibiotika an *Aliivibrio fischeri* gemäß DIN EN ISO 11348-2, n=1.

In der DIN EN ISO 11348-2 wird keine Mehrfachbestimmung verlangt, die eine statistische Evaluation der Daten ermöglichen würde. Aufgrund der Kosten für diese Messungen wurde daher auf eine Mehrfachbestimmungen verzichtet.

Es zeigt sich, dass die Leuchthemmung von LIN mit zunehmender Bestrahlungsdauer um insgesamt 13% abnimmt, während TED nach der Photolyse das Leuchten um 8% stärker hemmt als vor der Bestrahlung. Überraschend ist, dass LIN zwar nach der Bestrahlung eine

5. Wirkung

Restwirkung auf das Wachstum von *Bacillus subtilis* zeigte, die Photolyse von TED jedoch zu einer erhöhten Wirkung auf die Biolumineszenz führte.

Es muss dabei beachtet werden, dass dieser Test mit anderen Bakterien und unter deutlich anderen Bedingungen arbeitet als der Wachstumshemmtest, weswegen die Vergleichbarkeit begrenzt ist. Möglicherweise sind TED TP1 und TED TP3 deutlich wirksamer gegen *Aliivibrio fischeri* als gegen *Bacillus subtilis*. Letztendlich kann dieser Unterschied nicht vollständig geklärt werden.

6. Fazit

Ziel dieser Forschung war, zu klären, ob und wie sich Antibiotika in Oberflächenwasser durch Sonnenlicht umwandeln und welche Konsequenzen photolytische Reaktionen für die Wirkung der Substanzen auf Bakterien haben. Im Rahmen dieser Dissertation konnten damit neue Erkenntnisse über den solarinduzierten photolytischen Abbau von zwei Antibiotikaklassen gemacht werden. Die Betrachtung der photolytischen Abbaukinetik in Reinstwasser zeigte, dass alle sechs untersuchten Substanzen durch simuliertes Sonnenlicht in unterschiedlichem Maß abbaubar waren. Durch den Vergleich mit anderen Studien können die Oxazolidinon-Antibiotika zu den photolytisch langlebigsten Antibiotikaklassen gezählt werden. Die Abbaukinetik der β -Lactam-Antibiotika liegt eher im mittleren Bereich hinter den Sulfonamid- und Fluorquinolon-Antibiotika.

Die tatsächliche Abbaukinetik in der aquatischen Umwelt unterscheidet sich deutlich von diesen Werten. In dieser Studie konnte beobachtet werden, dass die Antibiotika in Oberflächenwasser langsamer durch Sonnenlicht abgebaut werden als in Reinstwasser. TED zeigte keinen photolytischen Abbau in Oberflächenwasser. Es ist hierbei zu beachten, dass sich Oberflächenwässer stark voneinander unterscheiden und daher keine konkreten photolytischen Reaktionskonstanten für den Abbau von Antibiotika in Oberflächenwasser pauschal angegeben werden können. Um die Kinetik des direkten und indirekten photolytischen Abbaus der Antibiotika näher zu untersuchen, könnte die Photolyse mit monochromatischem Licht verschiedener Wellenlängen untersucht werden. Dies gäbe Aufschluss darüber, welcher Spektralbereich des Sonnenlichts zu welchen photolytischen Reaktionen führt. Dadurch könnten insbesondere Unterschiede zwischen verschiedenen Studien geklärt werden, in denen unterschiedliche Strahlungsquellen zur Simulation des Sonnenlichts genutzt werden. Weiterhin könnte auch der Einfluss des pH und der Wassertemperatur auf die Photolyse von Mikroschadstoffen untersucht werden, um umweltchemische Abbauprozesse genauer zu verstehen.

Die unter simuliertem Sonnenlicht entstandenen TPs der Antibiotika zeigten sowohl bekannte als auch bisher neuartige Reaktionen.

Eine besonders hohe Verlässlichkeit der Strukturvorschläge konnte durch den Einsatz von isotoopenmarkierten Substanzen erreicht werden. Für eine absolute Verlässlichkeit wären Referenzstandards aller TPs notwendig, mit denen die Strukturvorschläge verifiziert werden könnten.

Insbesondere PEN und LIN zeigten mehrere TPs, die aufgrund ihrer Molekülstruktur unter Verdacht stehen, weiterhin antibakteriell wirksam zu sein. Zwar erwiesen sich einige TPs der β -Lactam-Antibiotika mithilfe von Referenzstandards als antibakteriell unwirksam, jedoch konnten die vermeintlich wirksamen PEN TPa-b und LIN TP1-7 nicht als Reinsubstanz hinsichtlich der antibakteriellen Wirkung untersucht werden. Der Wachstumshemmtest an

6. Fazit

Bacillus subtilis konnte bestätigen, dass bei PEN und LIN eine Restwirkung nach der Photolyse bestehen bleibt.

In Abwasser und Oberflächenwasser liegen die Konzentrationen an Antibiotika deutlich niedriger als in den experimentell verwendeten Lösungen. Somit ist in der aquatischen Umwelt keine inhibitorische Wirkung der TPs auf Bakterien zu erwarten. In wie weit die hier beschriebenen TPs einen sub-inhibitorischen Effekt auf Bakterien hinsichtlich der Entstehung und Verbreitung wirken, ist ein möglicher Bestandteil zukünftiger umweltmikrobiologischer Forschung. Letztlich konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass nicht nur Antibiotika selbst, sondern auch TPs, die beispielsweise durch Photolyse entstehen können, antibakteriell wirksam sein können und somit ein umweltchemisch relevantes Themengebiet bilden. Nichtsdestotrotz ist eine umsichtige Anwendung der Antibiotika letztendlich die wichtigste Maßnahme zur Vorbeugung gegen resistente Keime.

7. Quellenverzeichnis

- Albini, A., 2016. Photochemistry - Past, Present and Future. Springer, Heidelberg, Germany.
- Alexander, J., Bollmann, A., Seitz, W., Schwartz, T., 2015. Microbiological characterization of aquatic microbiomes targeting taxonomical marker genes and antibiotic resistance genes of opportunistic bacteria. *Sci. Total Environ.* 512-513. 316-325.
- Alexy, R., 2003. Dissertation - Antibiotika in der aquatischen Umwelt: Eintrag, Elimination und Wirkung auf Bakterien. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
- Akiyama, T., Savin, M.C., 2010. Populations of antibiotic-resistant coliform bacteria change rapidly in a wastewater effluent dominated stream. *Sci. Total Environ.* 408, 6192-6201.
- Atkins, P., de Paula, J. 2006. Physical Chemistry. Oxford Press. 8. Auflage.
- Bahn Müller, S., von Gunten, U., Canonica, S., 2014. Sunlight-induced transformation of sulfadiazine and sulfamethoxazole in surface waters and wastewater effluents. *Water Res.* 57, 183-192.
- Barbachyn, M.R., Ford, C.W., 2003. Oxazolidinone structure-activity relationships leading to linezolid. *Angewandte Chemie: International Edition in English.* 42, 18, 2010-2023.
- Batchu, S.R., Panditi, V.R., O'Shea, K.E., Gardinali, P.R., 2014. Photodegradation of antibiotics under simulated solar radiation: Implications for their environmental fate. *Sci. Total Environ.* 470-471, 299-310.
- Becker, D., Varela Della Giustina, S., Rodriguez-Mozaz, S., Schoevaart, R., Barceló, D., de Cazes, M., Belleville, M.P., Sanchez-Marcano, J., de Gunzburg, J., Couillerot, O., Völker, J., Oehlmann, J., Wagner, M., 2016. Removal of antibiotics in wastewater by enzymatic treatment with fungal laccase - Degradation of compounds does not always eliminate toxicity. *Bioresour. Technol.* 219, 500-509.
- Benedict, R.G., Schmidt, W. H. Coghill, R.R., Oleson, A.P., 1946. The stability of penicillin in aqueous solution. *J. Bacteriol.* 51, 291.
- Bensaci, M., Sahm, D., 2017. Surveillance of tedizolid activity and resistance: In vitro susceptibility of Gram-positive pathogens collected over 5 years from the United States and Europe. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 87, 133-138.
- Bergamini, G., Silvi, S., 2016. Applied Photochemistry. Springer International Publishing, Brooklyn, USA.
- Bergmann, A., Fohrmann, R., Weber, F.A., 2011. Zusammenstellung von Monitoringdaten zu Umweltkonzentrationen von Arzneimitteln. Dessau Roßlau, Germany.

- Bhattacharjee, M.K., 2016. *Chemistry of Antibiotics and Related Drugs*. 1st ed. Springer International Publishing. Brooklyn. USA.
- Bi, R., Qin, T., Fan, W., Ma, P., Gu, B., 2018. The emerging problem of linezolid-resistant enterococci. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 13, 11-19.
- BLAC (Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit) 2003. *Arzneimittel in der Umwelt –Auswertung der Untersuchungsergebnisse*.
<http://www.blac.de/servlet/is/2146/P-2c.pdf> (abgerufen am 18. September 2018).
- Blenheim Pharmacal Inc. 2015. Penicillin V Potassium Tablet.
- Boreen, A.L., Edlund, B.L., Cotner, J.B., McNeill, K., 2008. Indirect photodegradation of dissolved free amino acids: the contribution of singlet oxygen and the differential reactivity of DOM from various sources. *Environ. Sci. Technol.* 42, 15, 5492-5498.
- Brack, W., Altenburger, R., Küster, E., Meissner, B., Wenzel, K.D., Schüürmann, G., 2003. Identification of toxic products of anthracene photomodification in simulated sunlight. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2228-2237.
- Brickner, S.J., 1996. Oxazolidinone antibacterial agents. *Current Pharmaceutical Design.* 2, 175-194.
- Brown, P.C., Borowska, E., Schwartz, T., Horn, H., 2019. Impact of the particulate matter from wastewater discharge on the abundance of antibiotic resistance genes and facultative pathogenic bacteria in downstream river sediments. *Sci. Total Environ.* 691, 1171-1178.
- Calvert, J.G., Pitts, N.J., 1967. *Photochemistry*. Wiley. New York.
- Cars, O., Mölstadt, S., Melander, A., 2001. Variation in antibiotic use in the European Union. *Lancet.* 357, 1851-1853.
- Carvalho, I.T., Santos, L., 2016. Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environ. Int.* 94, 736–757.
- Chen, R., Shen, K., Chang, X., Tanaka, T., Li, L., Hu, P., 2016. Pharmacokinetics and Safety of Tedizolid after Single and Multiple Intravenous/Oral Sequential Administrations in Healthy Chinese Subjects. *Clin. Ther.* 38, 1869-1879.
- Christian, G.D. 2004. *Analytical Chemistry*. John Wiley und Sons Press.
- Cory, R.M., Cotner, J.B., McNeill, K., 2009. Quantifying interactions between singlet oxygen and aquatic fulvic acids. *Environ. Sci. Technol.* 43, 3, 718-723.

- Davies, J., Spiegelman, G.B., Yim, G., 2006. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 445-453.
- de Jager, T.L., Cockrell, A.E., Du Plessis, S.S., 2017. Ultraviolet Light Induced Generation of Reactive Oxygen Species. *J. Biol. Chem.* Springer Verlag.
- DellaGreca, M., Brigante, M., Isidori, M., Nardelli, A., Previtera, L., Rubino, M., Temussi, F., 2004. Phototransformation and ecotoxicity of the drug Naproxen-Na. *Environ. Chem. Lett.* 1, 237-241.
- Diekema, D.J., Jones, R.N., 2001. Oxazolidinone antibiotics. *Lancet.* 358, 1975-1982.
- Doll, T., Frimmel, F.H., 2004. Kinetic study of photocatalytic degradation of carbamazepine, clofibric acid, iomeprol and iopromide assisted by different TiO₂ materials- determination of intermediates and reaction pathways. *Water Res.* 38, 955-964.
- Elander, R.P., 2003. Industrial production of beta-lactam antibiotics. *Appli. Microbiol. and biotech.* 61, 385-392.
- Fasani, E., Tilocca, F., Albin, A., 2009. Photochemistry of Oxazolidinone Antibacterial Drugs. *Photochem. Photobiol.* 85, 879-885.
- Fasani, E., Tilocca, F., Protti, S., Merli, D., Albin, A., 2008. An exploratory and mechanistic study of the defluorination of an (aminofluorophenyl) oxazolidinone: SN1(Ar*) vs. SR+N1(Ar*) mechanism. *Org. Biomol. Chem.* 6, 4634-4642.
- Fatta-Kassinos, D., Vasquez, M.I., 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, 693-709.
- Fisher, J.F., Meroueh, S.O., Mobashery, S., 2005. Bacterial Resistance to β -Lactam Antibiotics: Compelling Opportunism. *Compelling Opportunity.* *Chem. Rev.* 105, 395-424.
- Gawel, E., Höck, W., Schindler, H., Holländer, R., Lautenschläger, S., Schimpke, J., Seim, S., 2015. Mikroverunreinigungen und Wasserabgabe. Umweltbundesamt.
- Germap: Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie, 2016. Germap 2015 - Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch. Rheinbach, Germany.
- Gmurek, M., Majewsky, M., Horn, H., 2015. Phototransformation of sulfamethoxazole under simulated sunlight: Transformation products and their antibacterial activity toward *Vibrio fischeri*. *Sci. Total Environ.* 538, 58-63.

- Goddemeier, C., 2006. Alexander Fleming (1881–1955): Penicillin. Deutsches Ärzteblatt. Jahrgang 103, 36, A2286.
- Gonzalez Ronquillo, M., Angeles Hernandez, J.C., 2017. Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: Review of impact and analytical methods. Food Control 72, 255-267.
- Gosh, S., Das, A.P. 2015. Modified titanium oxide (TiO₂) nanocomposites and its array of applications: A Review. Taylor und Francis-Verlag.
- Gozlan, I., Rotstein, A., Avisar, D., 2010. Investigation of an amoxicillin oxidative degradation product formed under controlled environmental conditions. Environ. Chem. 7, 435-442.
- Grandbois, M., Latch, D.E., McNeill, K. 2008. Microheterogeneous concentrations of singlet oxygen in natural organic matter isolate solutions. Environ. Sci. Technol. 42, 24, 9184-9190.
- Gualerzi, C.O., Brandi, L., Fabbretti, A., Pon, C.L., 2013. Antibiotics: Targets. Mechanism and Resistance. Wiley-VCH Verlag GmbH und Co. KGaA. Weinheim. Germany.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., Andersson, D.I., 2011. Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. PLoS Pathog. 7(7): e1002158.
- Günther, J., Kern, W.V., Nink, K., Schröder, H., de With, K., 2003. Solange sie noch wirken ... Kommentare und Analysen zum Antibiotikaverbrauch in Deutschland. WidO (Wissenschaftliches Institut der AOK. Universitätsklinikum Freiburg).
- Haag, W.R., Hoigne, J., 1986. Singlet oxygen in surface waters. 3.Photochemical formation and steady-state concentrations in various types of waters. Environ. Sci. Technol. 20, 4, 341-348.
- Haries, C., 1905. Ueber die Einwirkung des Ozons auf organische Verbindungen. Justus Liebigs Annalen der Chemie. 343, 2-3, 311-344.
- He, X., Mezyk, S.P., Michael, I., Fatta-Kasinos, D., Dionysiou, D.D., 2014. Degradation kinetics and mechanism of β -lactam antibiotics by the activation of H₂O₂ and Na₂S₂O₈ under UV-254 nm irradiation. J.Hazard. Chem. 279, 375-383.
- Herrmann, D.J., Peppard, W.J., Ledebor, N.A., Theesfeld, M.L., Weigelt, J.A., Buechel, B.J., 2008. Linezolid for the treatment of drug-resistant infections. Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 6, 825-848.

- Hillenbrand, T., Tettenborn, F., Menger-Krug, E., Marscheider-Weidemann, F., Fuchs, S., Toshovski, S., Kittlaus, S., Metzger, S., Tjoeng, I., Wermter, P., Kersting, M., Abbeglen, C., 2014. Maßnahmen zur Verminderung des Eintrages von Mikroschadstoffen in die Gewässer. Umweltbundesamt.
- Hirte, K., Seiwert, B., Schüürmann, G., Reemtsma, T., 2016. New hydrolysis products of the betalactam antibiotic amoxicillin, their pH-dependent formation and search in municipal wastewater. *Water Res.* 88, 880-888.
- Holzgrabe, U., 2006. Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Penicillin G zu tricyclischen β -Lactamen. Wiley Verlag. Weinheim.
- Howe, R.A., Wotton, M., Noel, A.R., Bowker, K.E., Walsh, T.R., MacGowan, A.P. 2003. Activity of AZD2563. a Novel Oxazolidinone against *Staphylococcus aureus* Strains with Reduced Susceptibility to Vancomycin or Linezolid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 11, 3651-3652.
- Hüser, T. 2018. Antibiotikaresistente Bakterien: Wie Forscher multiresistente Keime aus dem Abwasser fischen. PRO•CESS Chemie-Pharma-Verfahrenstechnik. 16.10.
- imedikament.de:
<https://imedikament.de/amoxicillin-200>
<https://imedikament.de/ampicillin-125>
<https://imedikament.de/penicillin-v-dura-1-5-mega>
<https://imedikament.de/piperacillin-2-g-hexal>
aufgerufen am 14.12.2018
- ISO 11348-3:2007. Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test).
- Junza, A., Montané, A., Barbosa, J., Minguillón, C., Barrón, D., 2014. High resolution mass spectrometry in the identification of transformation products and metabolites from β -lactam antibiotics in thermally treated milk. *J. Chromatogr.* 1368, 89-99.
- Kalia, V., Miglani, R., Purnapatre, K.P., Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Voleti, S.R., Upadhyay, D.J., Saini, K.S., Rattan, A., Rajj, V.S. 2009. Mode of Action of Ranbezolid against Staphylococci and Structural Modeling Studies of Its Interaction with Ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 53, 4, 1427-433.
- Kim, Y., Kim, A., Lee, S., Choi, S.H., Lee, D.Y., Song, J.-S., Lee, H., Jang, I.-J., Yu, K.-S., 2017. Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of Tedizolid Phosphate After Single-dose Administration in Healthy Korean Male Subjects. *Clin. Ther.* 39, 1849–1857.

- Kockler, J., Kanakaraju, D., Glass, B.D., Oelgemöller, M., 2012. *Photochemical and photocatalytic degradation of diclofenac and amoxicillin using natural and simulated sunlight*. *J. Sustainability Sci. Man.* 7, 23-29.
- Kondrakov, A.O., Ignatev, A.N., Lunin, V.V., Frimmel, F.H. Bräse, S., Horn, H. 2016. Roles of water and dissolved oxygen in photocatalytic generation of free OH radicals in aqueous TiO₂ suspensions: An isotope labeling study. *Appl. Cat. B: Environ.* 18, 424-430.
- Kulkarni, P., Olson, N.D., Raspanti, G.A., Goldstein, R.E.R., Gibbs, S.G., Sapkota, A., Sapkota, A.R., 2017. Antibiotic Concentrations Decrease during Wastewater Treatment but Persist at Low Levels in Reclaimed Water. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14, 1-13.
- Kümmerer, K., Henninger, A., 2003. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clin. Microbiol. Infect.* 9, 1203-1214.
- Küster, A., Lehmann, S., Hein, A., Schönfeld, J., 2013. Antibiotika in der Umwelt. Bundesumweltamt.
- Lam, M.W., Mabury, S.A., 2005. Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole natural waters. *Aquat. Sci.* 67, 177-188.
- Lambert, J.B., Gronert, G., Shurvell, H.F., Lightner, D.A., 2012. *Spektroskopie – Strukturaufklärung in der Organischen Chemie*. Pearson –Verlag. München. 2. Auflage.
- Längin, A., Alexy, R., König, A., Kümmerer, K., 2009. Deactivation and transformation products in biodegradability testing of β -lactams amoxicillin and piperacillin. *Chemosphere.* 75, 347-354.
- Lapworth, D.J., Baran, N., Stuart, M.E., Ward, R.S. 2012. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environ. Poll.* 163, 287-303.
- Latch, D.E., McNeill, K., 2006. Microheterogeneity of singlet oxygen distributions in irradiated humic acid solutions. *Science* 311, 5768, 1743-1747.
- Lei, Y., Jin, B., Ma, C., Zhang, T., Li, T., 2017. Identification of forced degradation products of tedizolid phosphate by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 139, 221–231.
- Li, D., Yang, M., Hu, J., Zhang, Y., Chang, H., Jin, F., 2008. Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Water Res.* 42, 307-317.

- Locke, J.B., Finn, J., Hilgers, M., Morales, G., Rahawi, S., Kedar, G.C., Picazo, J.J., Im, W., Shaw, K.J., Stein, J.L., 2010. Structure-Activity Relationships of Diverse Oxazolidinones for Linezolid-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Possessing the *cfr* Methyltransferase Gene or Ribosomal Mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 5337-5343.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., Clark, D.P., 2012. *Brock Biology of Microorganisms*. 14. Auflage, Pearson Press.
- Majewsky, M., Kolvenbach, B., Kroll, P., Timm, A., Kohler, H.P., Corvini, P.F.X., Horn, H., 2018. Beyond pollutant removal – understanding the biochemical mechanism of sulfonamide degradation in wastewater and the contribution of ipso-substitution. Abschlussbericht DFG 160332.
- Mangold, K., Shaw, S.A., Vollmer, V., 2013. The physics of near-infrared photography. *Eur. J. Phys.* 34, 51-71.
- Mansoob Khan, M., Adil, S.F., Al-Mayouf, A. 2015. Metal oxides as photocatalysts. *J. Saudi Chem. Soc.* 19, 462-464.
- Martin, G., Robins, R., Bowman, P., Duholke, W., Farley, K., Kaluzny, B., Guido, J., Sims, S., Thamann, T., Thompson, B., Nishimura, T., Noro, Y., Tahara, T., 1999. Susceptibility of Morpholine Substituents to Photo-oxidative Decomposition - Identification of Photo-Oxidative Degradants of Linezolid (PNU-100766). *J. Heterocycl. Chem.* 36, 265-271.
- Mauer, C., 2011. Technische und ökonomische Aspekte der separaten Erfassung und Behandlung von Krankenhausabwasser. Dissertation. Technische Hochschule Aachen, Aachen. Fakultät für Bauingenieurwesen.
- Mavronikola, C., Demetriou, M., Hapeshi, E., Partassides, D., Michael, C., Mantzavinos, D., Kassinos, D., 2009. Mineralisation of the antibiotic amoxicillin in pure and surface waters by artificial UV A and sunlight-induced Fenton oxidation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 1211-1217.
- Mendes, R.E., Deshpande, L.M., Jones, R.N., 2014a. Linezolid update: Stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resist. Updat.* 17, 1-12.
- Mendes, R.E., Hogan, P.A., Streit, J.M., Jones, R.N., Flamm, R.K., 2014b. Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) Program: report of linezolid activity over 9 years (2004-12). *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1582-1588.
- Merck Sharp und Dohme Corporation, 2017. Prescribing Information Sivextro.

- Michalska, K., Karpiuk, I., Król, M., Tyski, S., 2013. Recent development of potent analogues of oxazolidinone antibacterial agents. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 577-591.
- Mitchell, R., Gu, J.G., 2010. *Environmental Microbiology*. 14. Auflage, Wiley Blackwell Press.
- Mitchell, S.M., Ullman, J.L., Teel, A.L., Watts, R.J., 2014. pH and temperature effects on the hydrolysis of three β -lactam antibiotics: Ampicillin, cefalotin and cefoxitin. *Sci. Total Environ.* 466-467, 547-555.
- Munter, R., 2001. Advanced Oxidation Processes—Current Status and Prospects. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Chemistry.* 50. 2. 59-80.
- Myers, D.R., Kurtz, S.R., Emery, K.A., Whitaker, C., Townsend, T., 2000. Outdoor Meteorological Broadband and Spectral Conditions for Evaluating Photovoltaic Modules. *Conference Record of the Twenty-Eighth IEEE Photovoltaic Specialists Conference.* Anchorage, Alaska. 69-70.
- Nägele, E., Moritz, R., 2005. Structure Elucidation of Degradation Products of the Antibiotic Amoxicillin with Ion Trap MSⁿ and Accurate Mass Determination by ESI TOF. *J. Am. Soc. Mass Spec.* 16. 1670-1676.
- Nasa: www.nasa.gov/sites/default/files/thumbnails/image/thuill_astme590_lambda.png
aufgerufen am 4.10.2018
- Norrby, R., 2001. Linezolid - a review of the first oxazolidinone. *Expert Opin. Pharmacother.* 2, 293-302.
- Ong, V., Flanagan, S., Fang, E., Dreskin, H.J., Locke, J.B., Bartizal, K., Prokocimer, P., 2014. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of the Novel Antibacterial Prodrug Tedizolid Phosphate. *Drug Metab. Dispos.* 42, 1275-1284.
- Oppenländer, T., 2007. *Photochemical Processes of Water Treatment*. Wiley Online Library.
- Pan, M., Chu, L.M., 2017. Transfer of antibiotics from wastewater or animal manure to soil and edible crops. *Environ. Pollut.* 231, 829–836.
- Pfizer Inc, 2008. *Prescribing Information Zyvox*.
- Physik.cosmos: <https://physik.cosmos-indirekt.de/Physik-Schule/Sonnenschein>
aufgerufen am 19.11.2018
- Postigo, C., Sirtor, C., Oller, I., Malato, S., Maldonado, M.I., López de Alda, M., Barceló, D., 2011. Solar transformation and photocatalytic treatment of cocaine in water: Kinetics, characterization of major intermediate products and toxicity evaluation. *Appl. Catal. B Environ.* 104, 37-48.

- Prabhakaran, D., Sukul, P., Lamshöft, M., Maheswari, M.A., Zühlke, S., Spittler, M., 2009. Photolysis of difloxacin and sarafloxacin in aqueous systems. *Chemosphere* 77, 739–746.
- Rechenberg, B., 2015. Organische Mikroverunreinigungen in Gewässern: Vierte Reinigungsstufe für weniger Einträge. Bundesumweltamt
- Rizzo, L., Meric, S., Guida, M., Kassinos, D., Belgiorno, V., 2009. Heterogenous photocatalytic degradation kinetics and detoxification of an urban wastewater treatment plant effluent contaminated with pharmaceuticals. *Water Res.* 4, 4070-4078.
- Rubin, M.B., 2003. The History of Ozone Part III. C. D. Harries and the Introduction of Ozone into Organic Chemistry. *Helvetica chimica acta.* 86, 4, 930-940.
- Salgado, R., Pereira, V.J., Carvalho, G., Soeiro, R., Gaffney, V., Almeida, C., Vale Cardoso, V., Ferreira, E., Benoliel, M.J., Ternes, T.A., Oehmen, A., Reis, M.A.M., Noronha, J.P., 2013. Photodegradation kinetics and transformation products of ketoprofen, diclofenac and atenolol in pure water and treated wastewater. *J. Hazard. Mater.* 244-245, 516-527.
- Schaadt, R., Sweeney, D., Shinabarger, D., Zurenko, G., 2009. In Vitro Activity of TR-700, the Active Ingredient of the Antibacterial Prodrug TR-701, a Novel Oxazolidinone Antibacterial Agent. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3236-3239.
- Schröder, H., 2011. Hände weg von der eisernen Reserve. *Gesundheit und Gesellschaft.* 7-8.
- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., Obst, U., 2003. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 43, 325-335.
- Schwarzenbach, R.P., Gschwend, P.M., Imboden, D.M., 2003. Environmental Organic Chemistry, 2. Ausgabe. WILEY-Interscience, Hoboken, USA.
- Schymanski, E. L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H. P., Hollender, J., 2014. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ. Sci. Technol.* 48, 2097–2098.
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Danish Rizvi, S.M., Amjad Kamal, M., 2015. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J. Biological Sci.* 22, 90-101.

- Shaw, K.J., Barbachyn, M.R., 2011. The oxazolidinones: past, present, and future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1241, 48-70.
- Slatter, J.G., Stalker, D.J., Feenstra, K.L., Welshman, I.R., Bruss, J.B., Sams, J.P., Johnson, M.G., Sanders, P.E., Hauer, M.J., Fagerness, P.E., Stryd, R.P., Peng, G.W., Shobe, E.M., 2001. Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of linezolid following an oral dose of [¹⁴C]linezolid to healthy human subjects. *Drug Metab. Dispos.* 29, 1136-1145.
- Städtebauliche Klimafibel:
http://www.staedtebauliche-klimafibel.de/images_DE/abb-3-4.gif
aufgerufen am 20.12.2018
- Stalker, D.J., Jungbluth, G.L., Hopkins, N.K., Batts, D.H., 2003. Pharmacokinetics and tolerance of single- and multiple-dose oral or intravenous linezolid, an oxazolidinone antibiotic, in healthy volunteers. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 1239-1246.
- Timm, A., Borowska, E., Majewsky, M., Merel, S., Zwiener, C., Bräse, S., Horn, H., 2019. Photolysis of four β -lactam antibiotics under simulated environmental conditions: Degradation, Transformation Products and Antibacterial Activity. *Sci. tot. environ.* 651, 1, 1605-1612.
- Timm, A., Glauner, T., Majewsky, M., Peschke, R., Horn, H., 2017. Analysis of Four β -Lactam Antibiotics in Water Using an Agilent 1290 Infinity II LC and an Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS with Direct Injection and Online SPE. *Application Note. Agilent Technologies.*
- Tiwari, R.N., Bonde, C.G., 2012. LC, LC-MS/TOF, and MSⁿ studies for the separation, Identification, and characterization of degradation products of linezolid. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 35, 188-203.
- Trovó, A.G., Nogueira, R.F.P., Agüera, A., Fernandez-Alba, A.R., Malato, S., 2011. Degradation of the antibiotic amoxicillin by photo-Fenton Process - Chemical and toxicological assessment. *Water Res.* 45, 1394-1402.
- Turro, N.J., 1991. *Modern Molecular Photochemistry.* Benjamin Cummings. Menlo Park. CA.
- Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A., Laxminarayan, R., 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 5649-5654.
- Vaughan, P.P., Blough, N.V., 1998. Photochemical formation of hydroxyl radical by constituents of natural waters. *Environ. Sci. Technol.* 32, 19, 2947-2953.

- Wammer, K.H., Lapara, T.M., McNeill, K., Arnold, W.A., Swackhamer, D.L., 2006. Changes in antibacterial activity of triclosan and sulfa drugs due to photochemical transformations. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1480-1486.
- Willey, J.M., Sheerwood, L.M., Woolverton, C.J., 2009. *Prescotts Principles of Microbiology*. Mc Graw-Hill-Press.
- Yang, Y., Rasmussen, B.A., Shlaes, D.M., 1999. Class A beta-lactamases-enzyme-inhibitor interactions and resistance. *Pharmacol. Ther.* 83, 141-151.
- Xu, H., Cooper, W.J., Jung, J., Song, W., 2011: Photosensitized degradation of amoxicillin in natural organic matter isolate solutions. *Water Res.* 45, 632-638.
- Zafiriou, O.C., Jousot-Dubien, J., Zepp, R.G., Zika, R.G. 1984. Photochemistry of natural waters. *Environ. Sci. Technol.*, 18, 358-371.
- Zessel, K., Mohring, S., Hamscher, G., Kietzmann, M., Stahl, J., 2014. Biocompatibility and antibacterial activity of photolytic products of sulfonamides. *Chemosphere.* 100, 167-174.
- Zhanel, G.G., Love, R., Adam, H., Golden, A., Zelenitsky, S., Schweizer, F., Gorityala, B., Lagacé-Wiens, P.R.S., Rubinstein, E., Walkty, A., Gin, A.S., Gilmour, M., Hoban, D.J., Lynch 3rd, J.P., Karlowsky, J.A., 2015. Tedizolid: A Novel Oxazolidinone with Potent Activity Against Multidrug-Resistant GramPositive Pathogens. *Drugs* 75, 253-270.

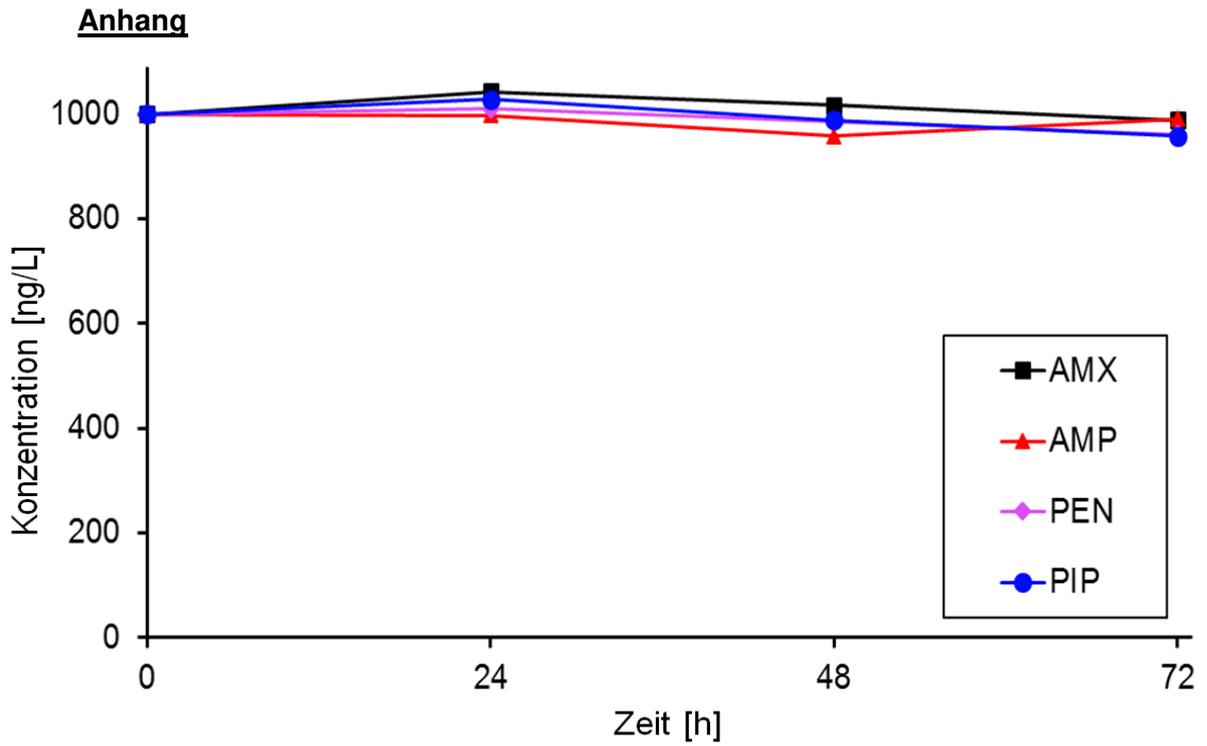


Abb. Anhang 1: β -Lactam-Antibiotikakonzentration der Dunkelkontrollen.

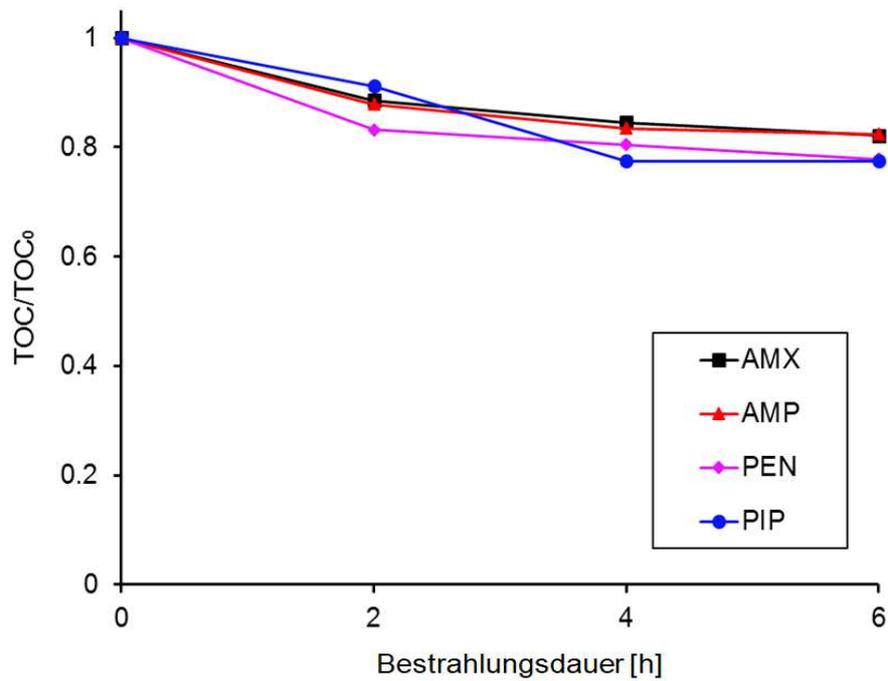


Abb. Anhang 2: Mineralisierung von β -Lactam-Antibiotika als TOC-Rückgang unter UV₂₅₄-Bestrahlung, STDV < 5%.

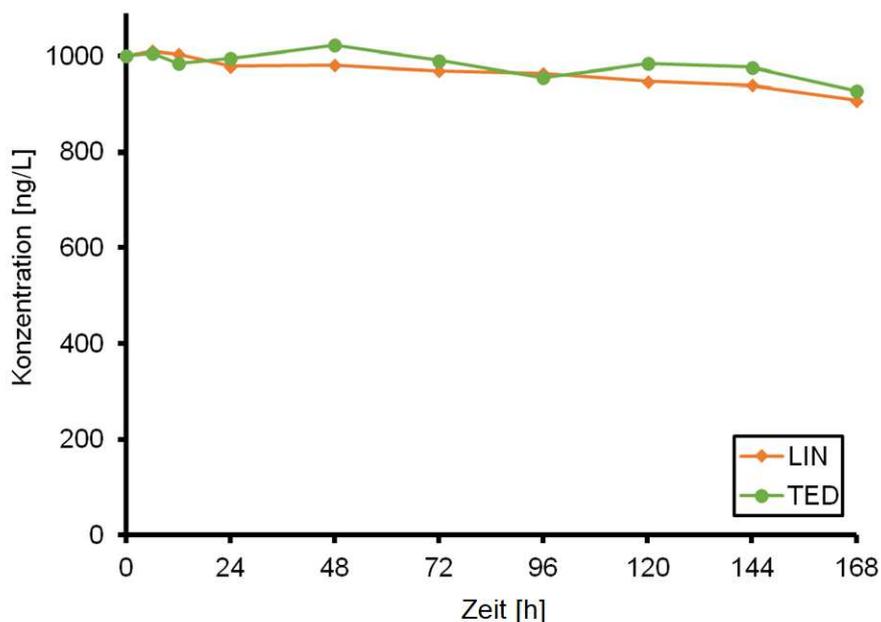


Abb. Anhang 3: Oxazolidinon-Antibiotikakonzentration der Dunkelkontrollen.

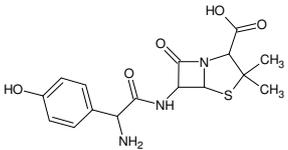
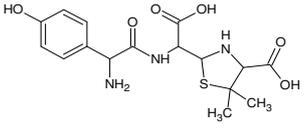
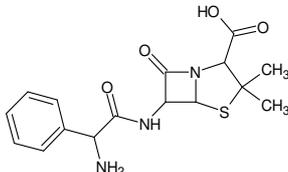
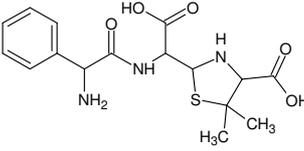
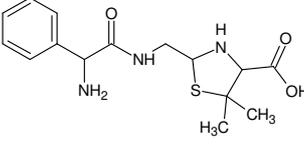
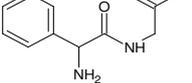
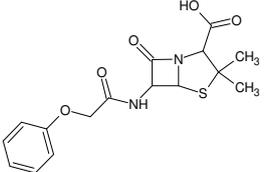
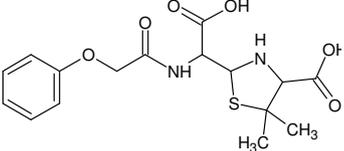
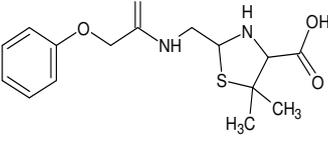
Tab. Anhang 1: Reaktionskonstanten des photolytischen Abbaus von β -Lactam-Antibiotika in Oberflächenwasser unter simuliertem Sonnenlicht [1/h].

	AMX	AMP	PIP	PEN
OW 1	0,021 ± 0,005	0,016 ± 0,004	0,032 ± 0,010	0,009 ± 0,004
OW 1 dunkel	0,007 ± 0,004	0,003 ± 0,003	0,020 ± 0,010	0,007 ± 0,002
OW 2	0,041 ± 0,011	0,042 ± 0,006	0,041 ± 0,011	0,026 ± 0,002
OW 2 dunkel	0,013 ± 0,010	0,020 ± 0,018	0,029 ± 0,011	0,015 ± 0,011

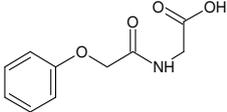
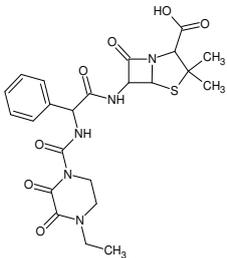
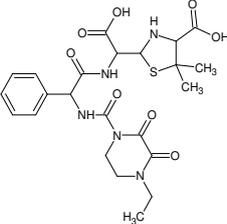
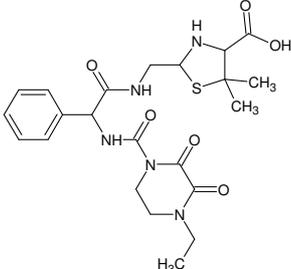
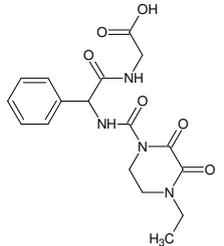
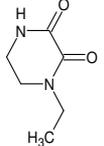
Tab. Anhang 2: Reaktionskonstanten des photolytischen Abbaus von Oxazolidinon-Antibiotika in Oberflächenwasser unter simuliertem Sonnenlicht [1/h].

	LIN	TED
OW 1	0,021 ± 0,001	0,005 ± 0,001
OW 1 dunkel	0,001 ± 0,000	0,005 ± 0,003
OW 2	0,022 ± 0,001	0,006 ± 0,002
OW 2 dunkel	0,001 ± 0,000	0,005 ± 0,003

Tab. Anhang 3: Übersicht der TPs der β -Lactam-Antibiotika.

TP	t_R	[m/z]	Strukturvorschlag
AMX	0,66	366,1116	$C_{16}H_{19}N_3O_5S$ 6-[2-amino(4-hydroxyphenyl)acetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxylsäure 
AMX TP1	0,66	384,1178	$C_{16}H_{21}N_3O_6S$ 2-[[2-amino(4-hydroxyphenyl)acetamido](carboxy)methyl]-5,5-dimethyl-1,3-thiazolidin-4-carboxylsäure 
AMP	2,7	350,1165	$C_{16}H_{19}N_3O_4S$ 6-[2-amino(phenyl)acetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxylsäure 
AMP TP1	1,85	368,1275	$C_{16}H_{21}N_3O_5S$ 2-[[2-amino(phenyl)acetamido](carboxy)methyl]-5,5-dimethyl-1,3-thiazolidin-4-carboxylsäure 
AMP TP2	1,85	324,1381	$C_{15}H_{21}N_3O_3S$ 2-[[2-amino(phenyl)acetamido]-methyl]-5,5-dimethyl-1,3-thiazolidin-4-carboxylsäure 
AMP TP3	0,6	209,0924	$C_{10}H_{12}N_2O_3$ [2-amino(phenyl)acetamido]-Essigsäure 
PEN	5,8	351,1020	$C_{16}H_{18}N_2O_5S$ 3,3-dimethyl-7-oxo-6-[(phenoxy-carbonyl)amino]-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxylsäure 
PEN TP1	5,1	369,1114	$C_{16}H_{20}N_2O_6S$ 5,5-dimethyl-2-{2-oxo-1-[(phenoxy-carbonyl)amino]propyl}-1,3-thiazolidin-4-carboxylsäure 
PEN TP2	3,6	325,1227	$C_{15}H_{20}N_2O_4S$ 5,5-dimethyl-2-[[[(phenoxy-carbonyl)amino]methyl]-1,3-thiazolidin-4-carboxylsäure 

Anhang

PEN TP3	2,8	210,0765	$C_{10}H_{11}NO_4$ Phenyl (2-oxopropyl)carbamate	
PIP	4,9	518,1688	$C_{23}H_{27}N_5O_7S$ (2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-6-[(<i>R</i>)-2-(4-Ethyl-2,3-dioxopiperazin-1-carboxamido)-2-phenylacetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carbonsäure	
PIP TP1	4,1	536,1820	$C_{23}H_{29}N_5O_8S$	
PIP TP2	3,9	492,1910	$C_{22}H_{30}N_5O_6S$	
PIP TP3	3,8	377,1443	$C_{17}H_{20}N_4O_6$ 4-ethyl- <i>N</i> -{1-(4-hydroxyphenyl)-2-oxo-2-[(2-oxopropyl)amino]ethyl}-2,3-dioxopiperazin-1-carboxamid	
PIP TP4	0,8	143,0807	$C_6H_{10}N_2O_2$ 1-ethylpiperazin-2,3-dion	

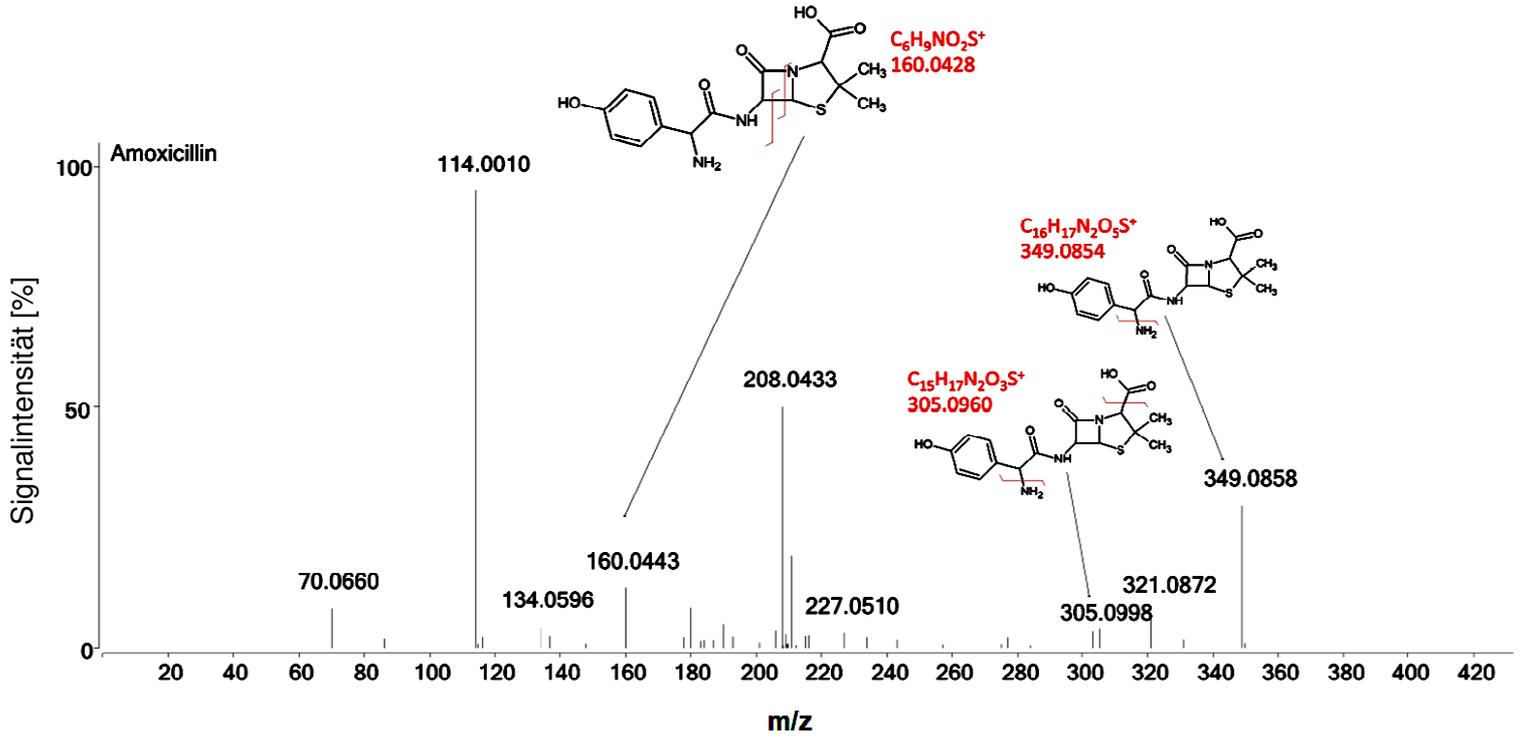


Abb. Anhang 4: QToF-Spektrum von AMX.

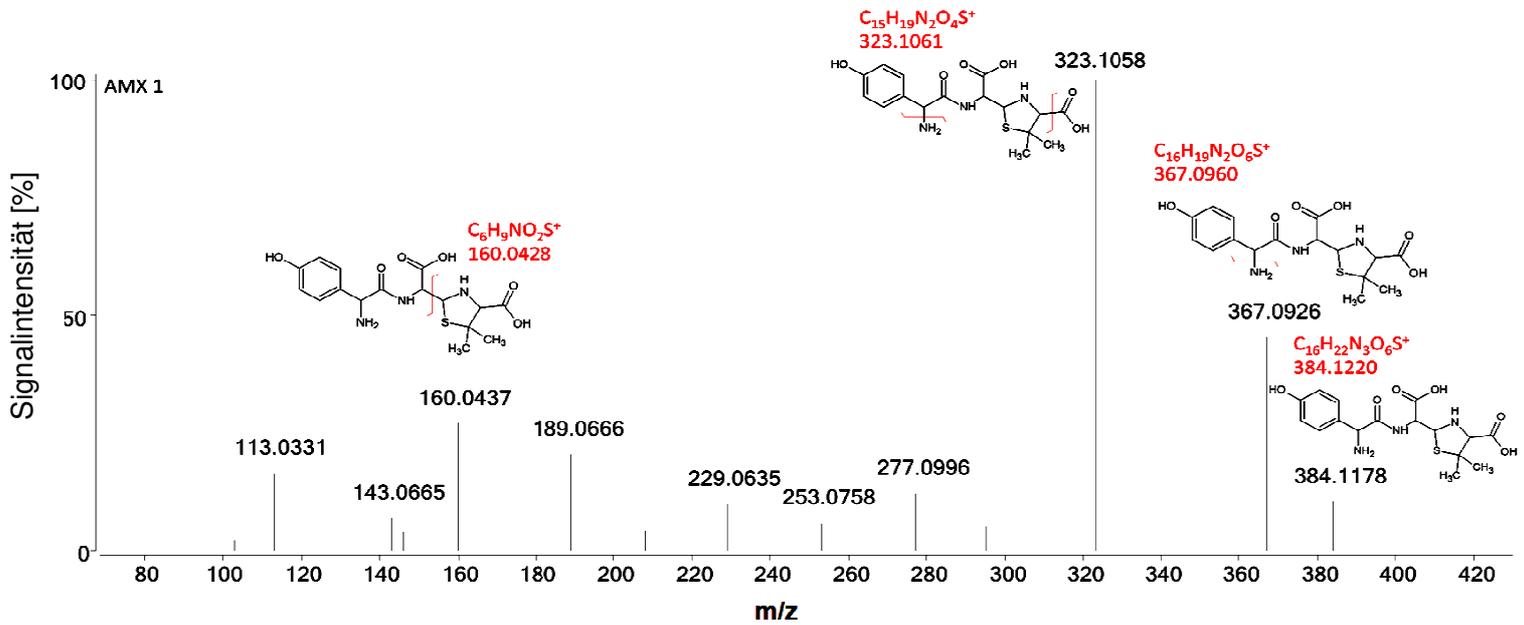


Abb. Anhang 5: QToF-Spektrum von AMX TP1.

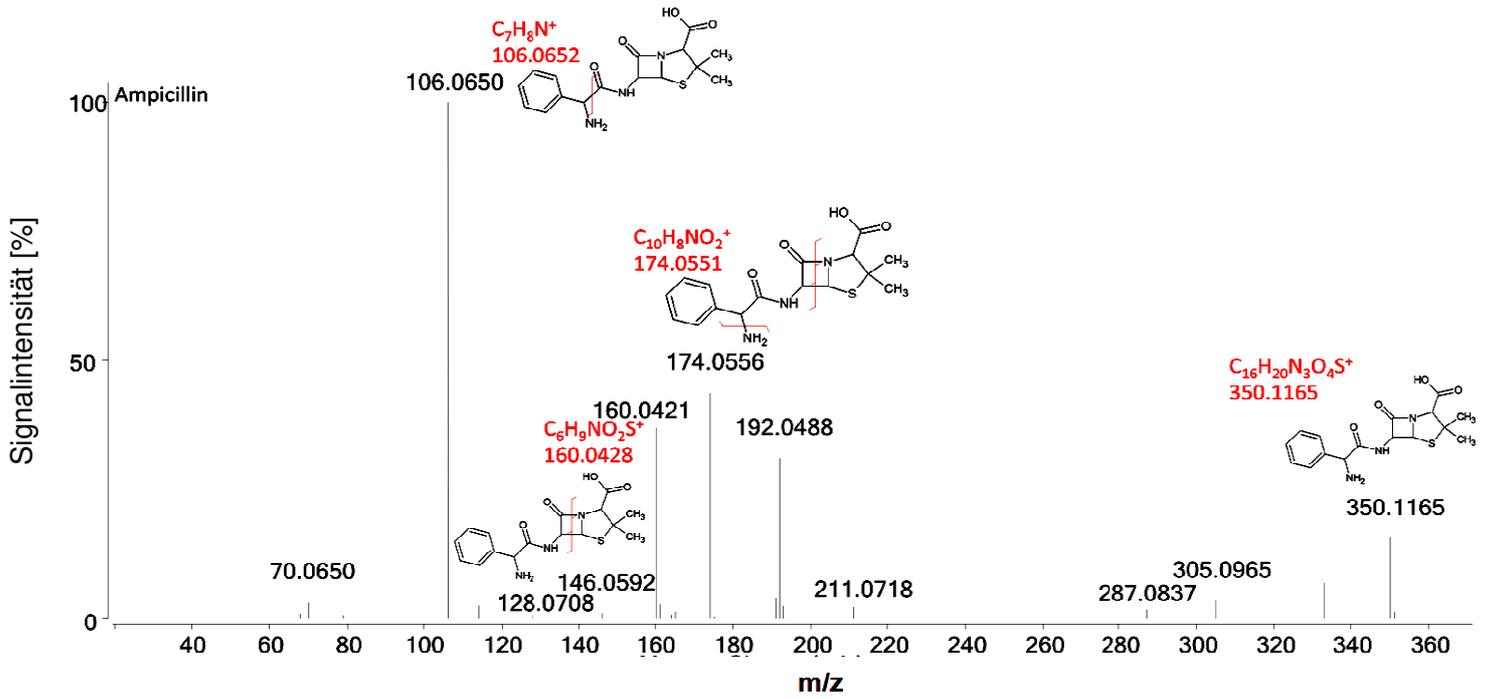


Abb. Anhang 6: QToF-Spektrum von AMP.

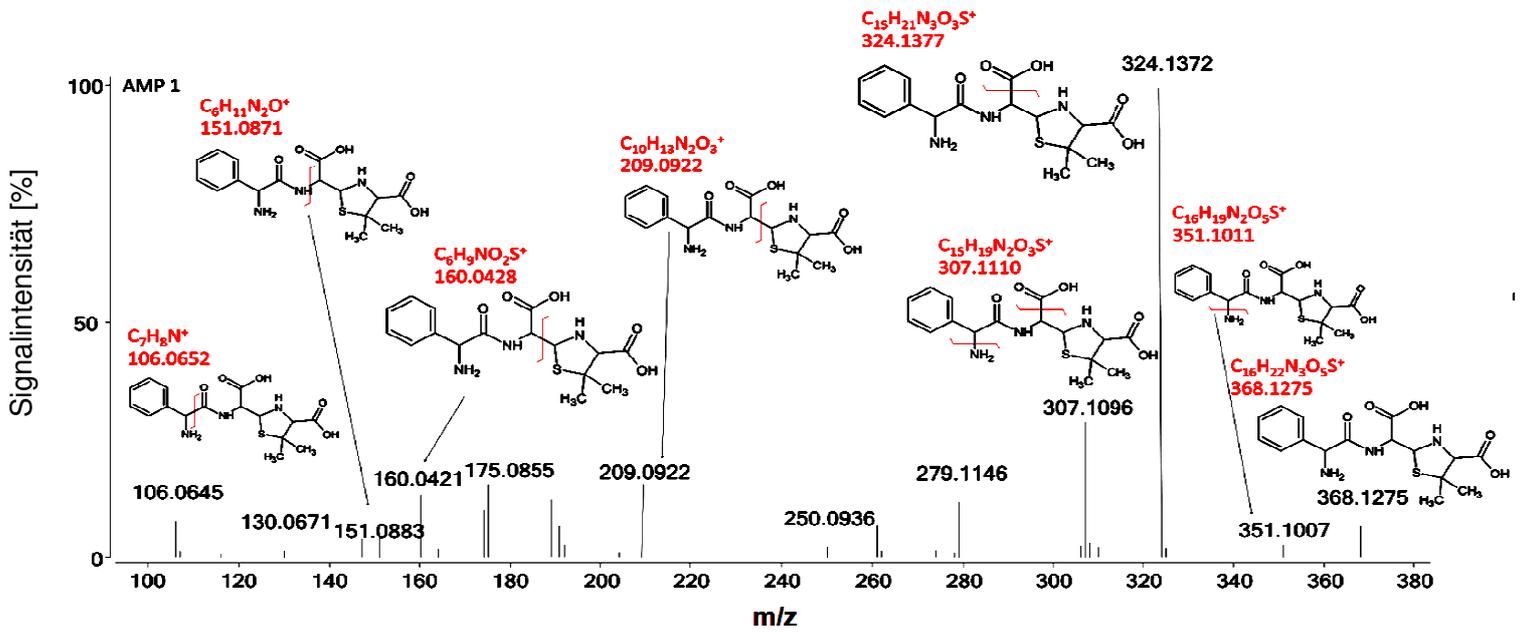


Abb. Anhang 7: QToF-Spektrum von AMP TP1.

Anhang

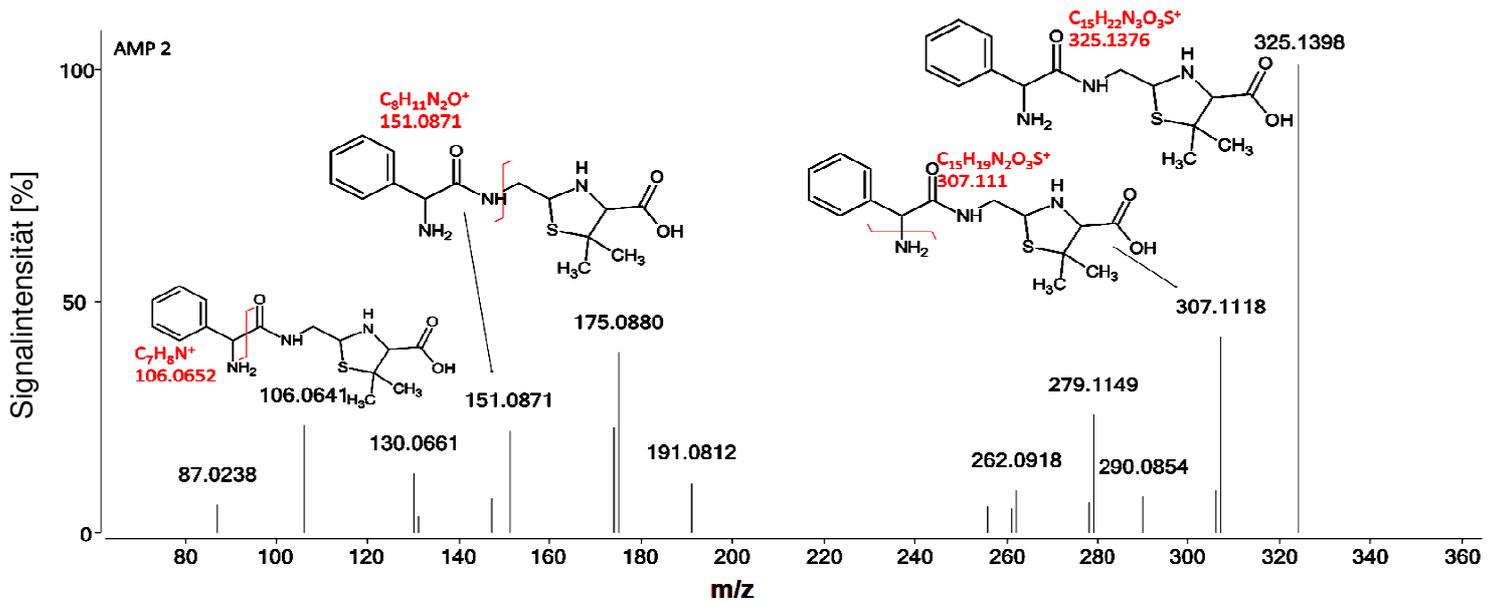


Abb. Anhang 8: QToF-Spektrum von AMP TP2.

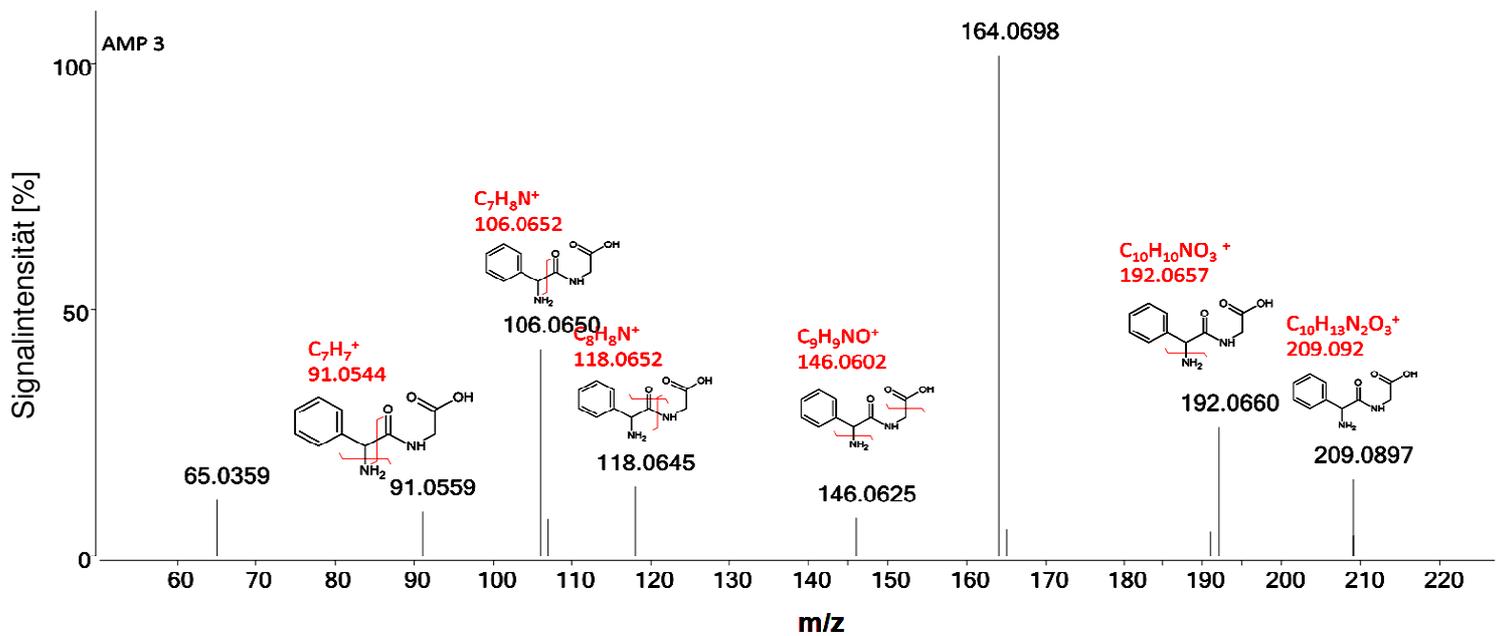


Abb. Anhang 9: QToF-Spektrum von AMP TP3.

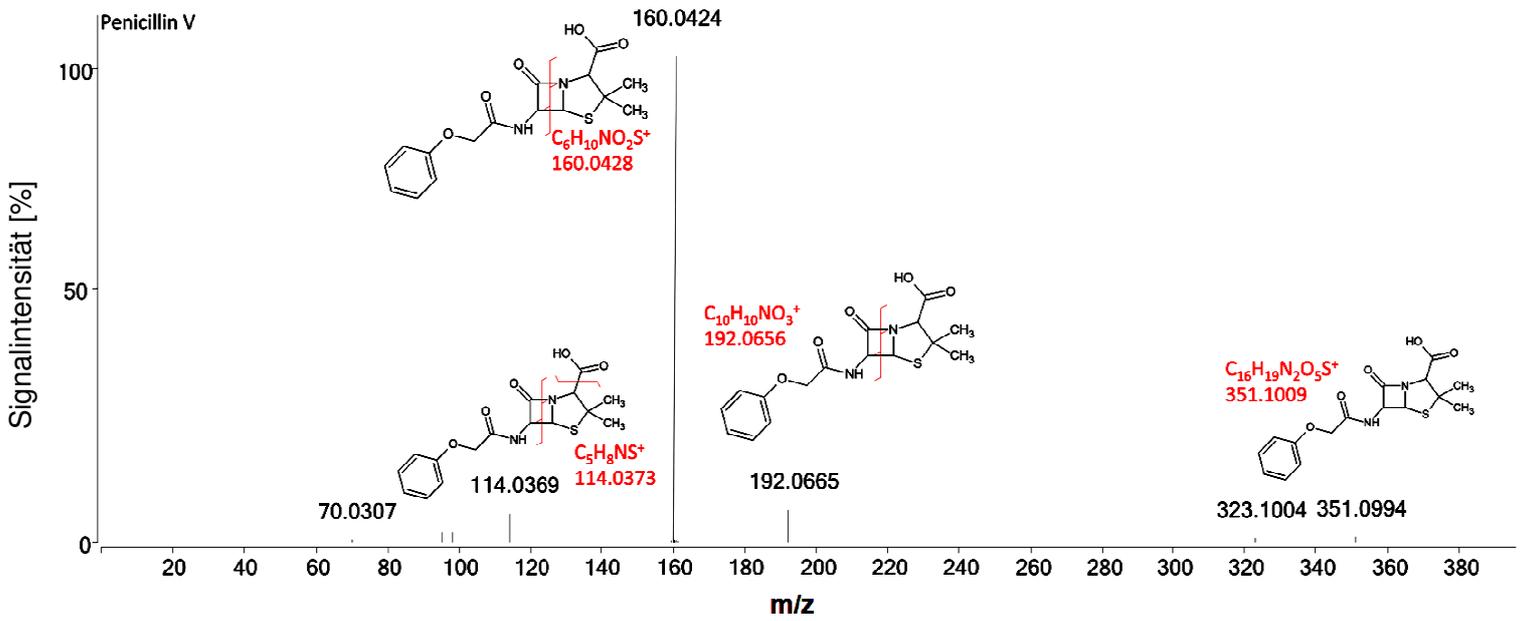


Abb. Anhang 10: QToF-Spektrum von PEN.

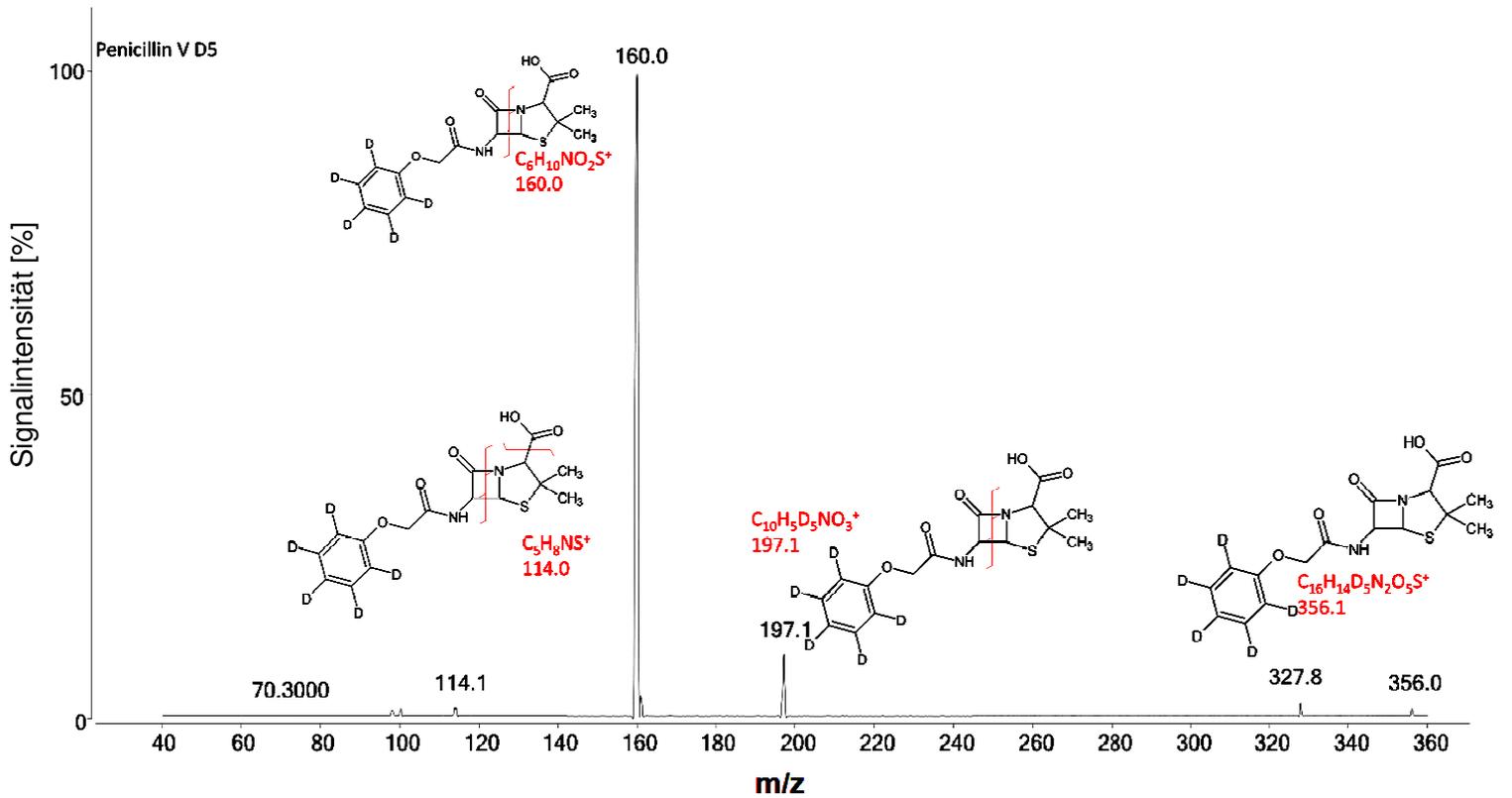


Abb. Anhang 11: QqQ Spektrum von PEN-D5.

Anhang

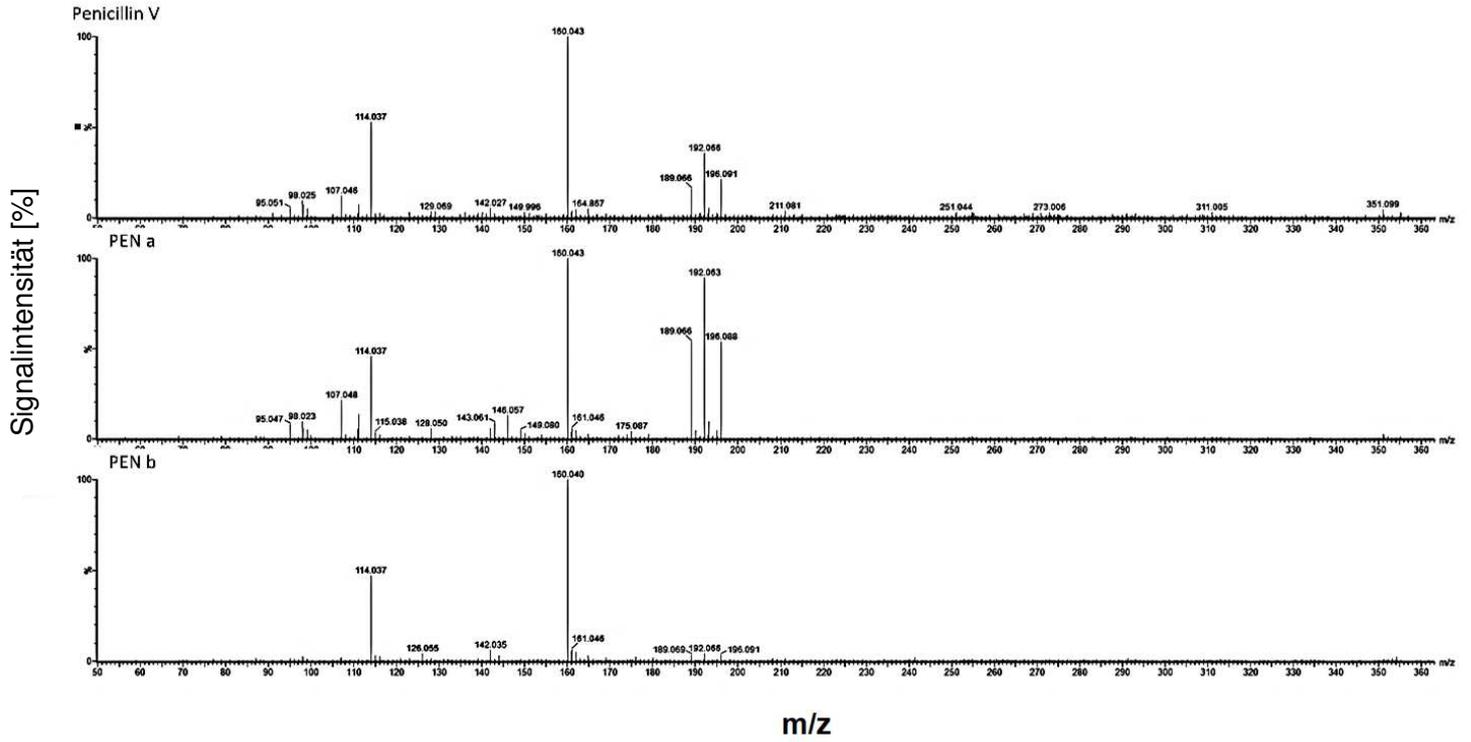


Abb. Anhang 12: QToF-Spektren von PEN und TPs a-b.

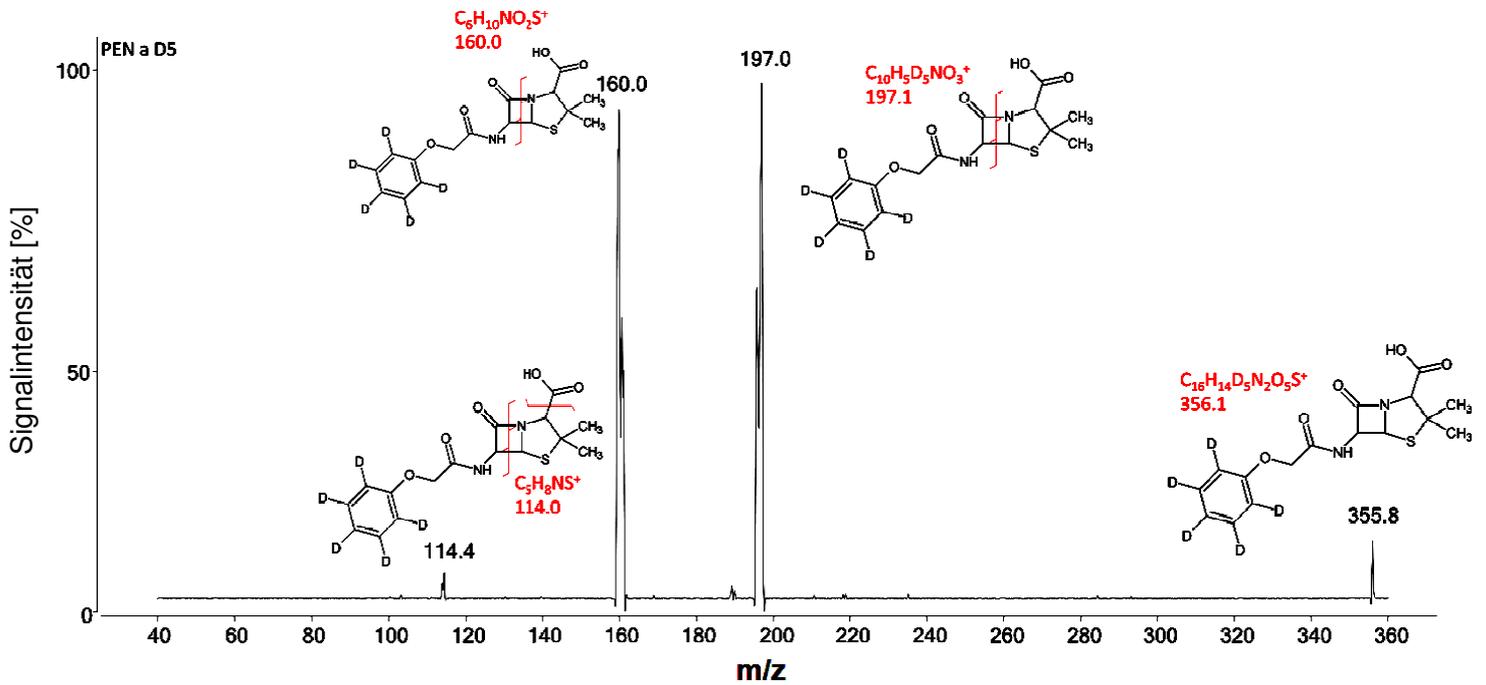


Abb. Anhang 13: QqQ Spektrum von PEN TPa-D5.

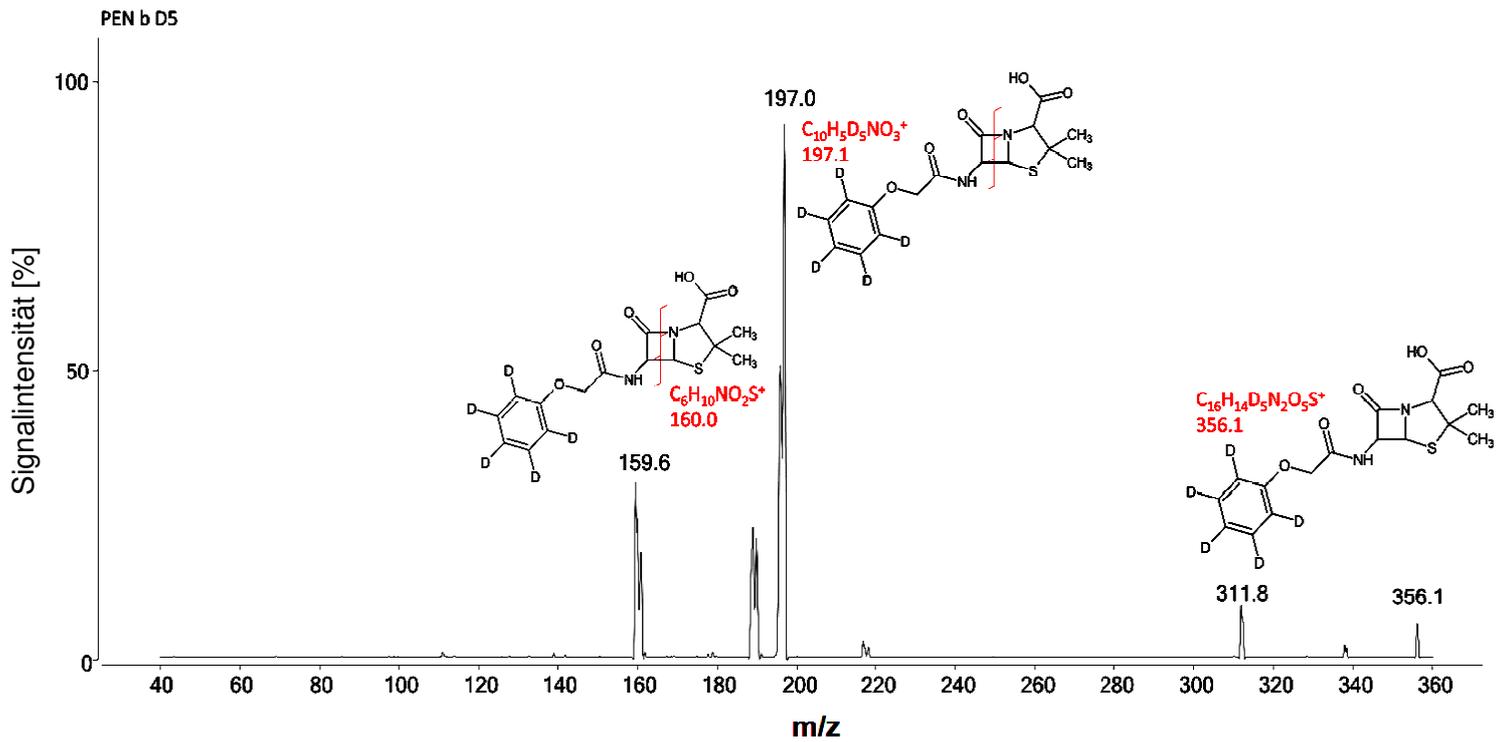


Abb. Anhang 14: QqQ Spektrum von PEN TPb-D5.

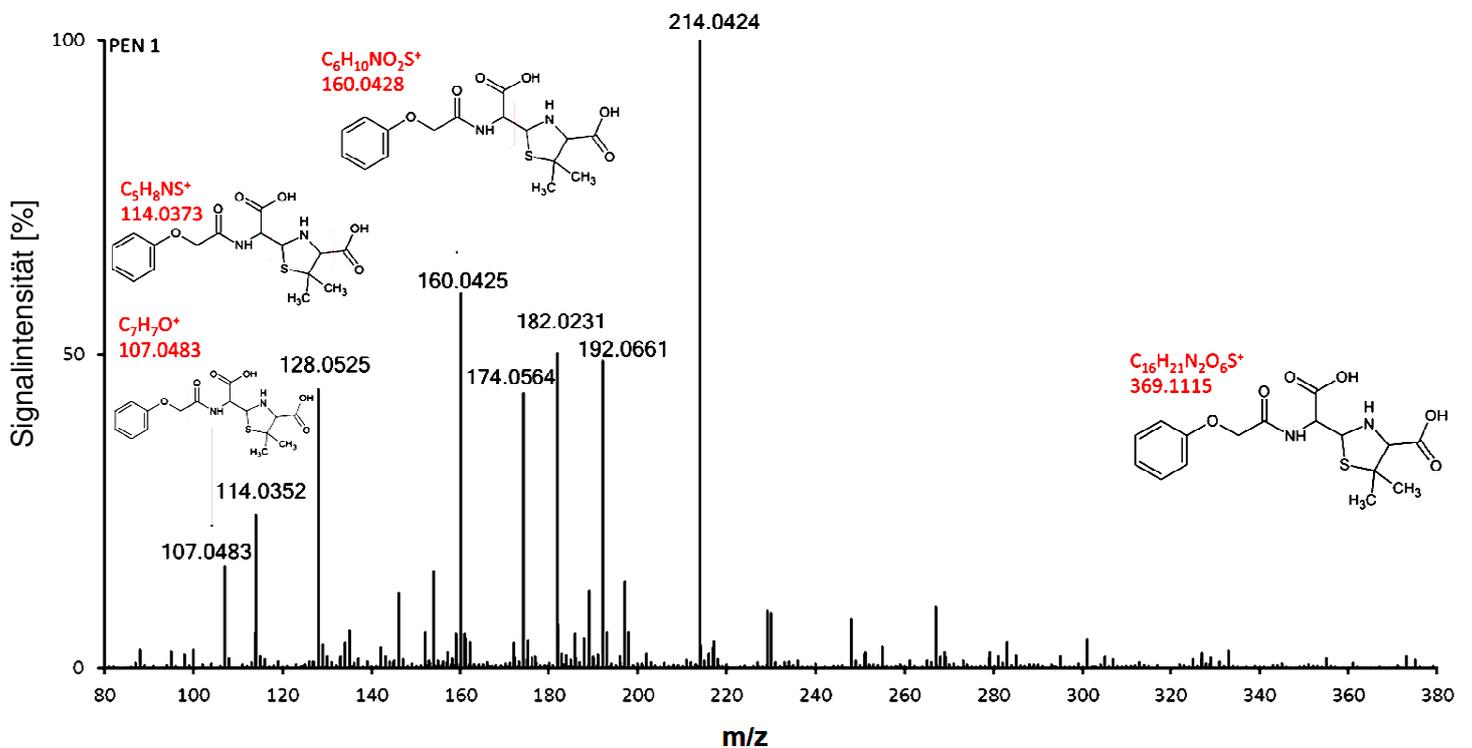


Abb. Anhang 15: QToF-Spektrum von PEN TP1.

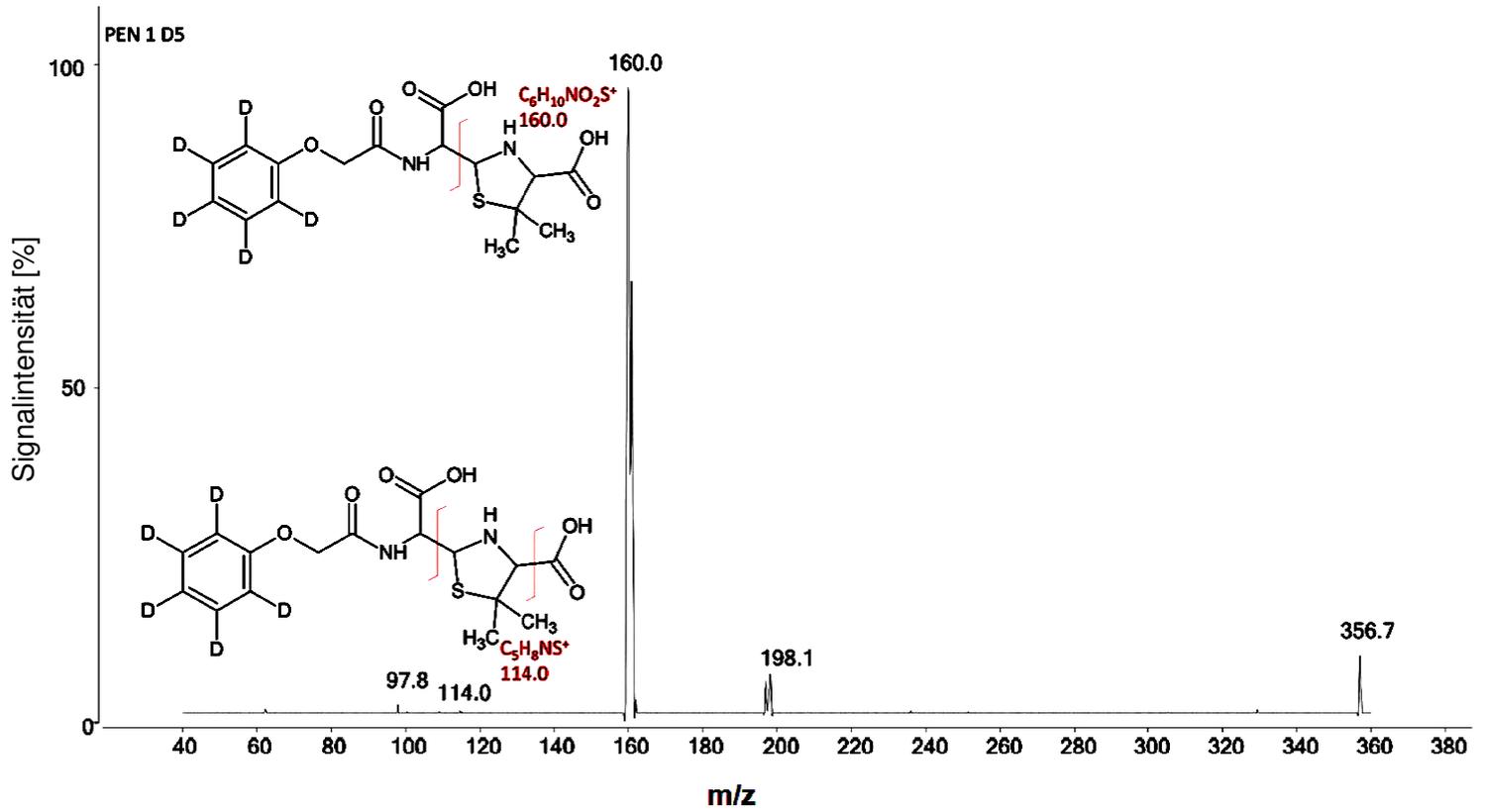


Abb. Anhang 16: QqQ Spektrum von PEN TP1-D5.

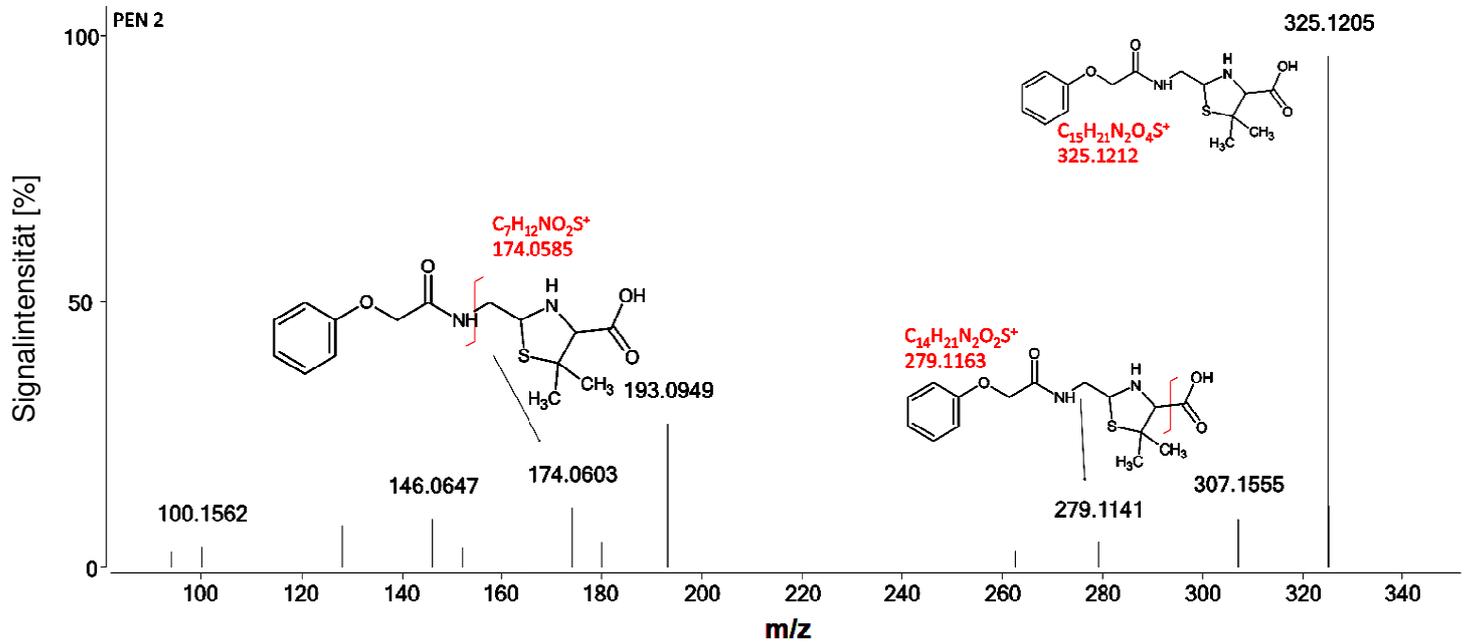


Abb. Anhang 17: QToF-Spektrum von PEN TP2.

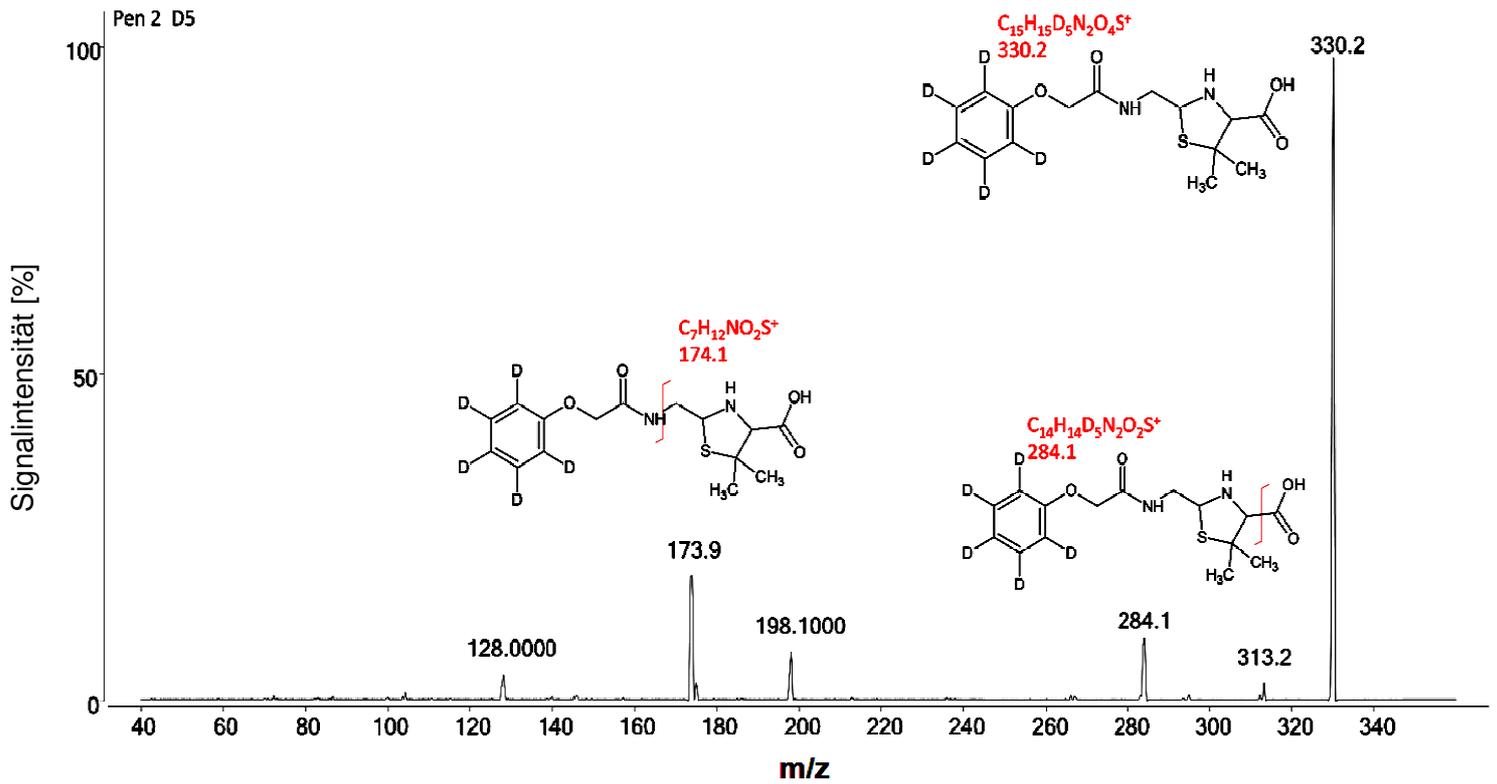


Abb. Anhang 18: QqQ Spektrum von PEN TP2-D5.

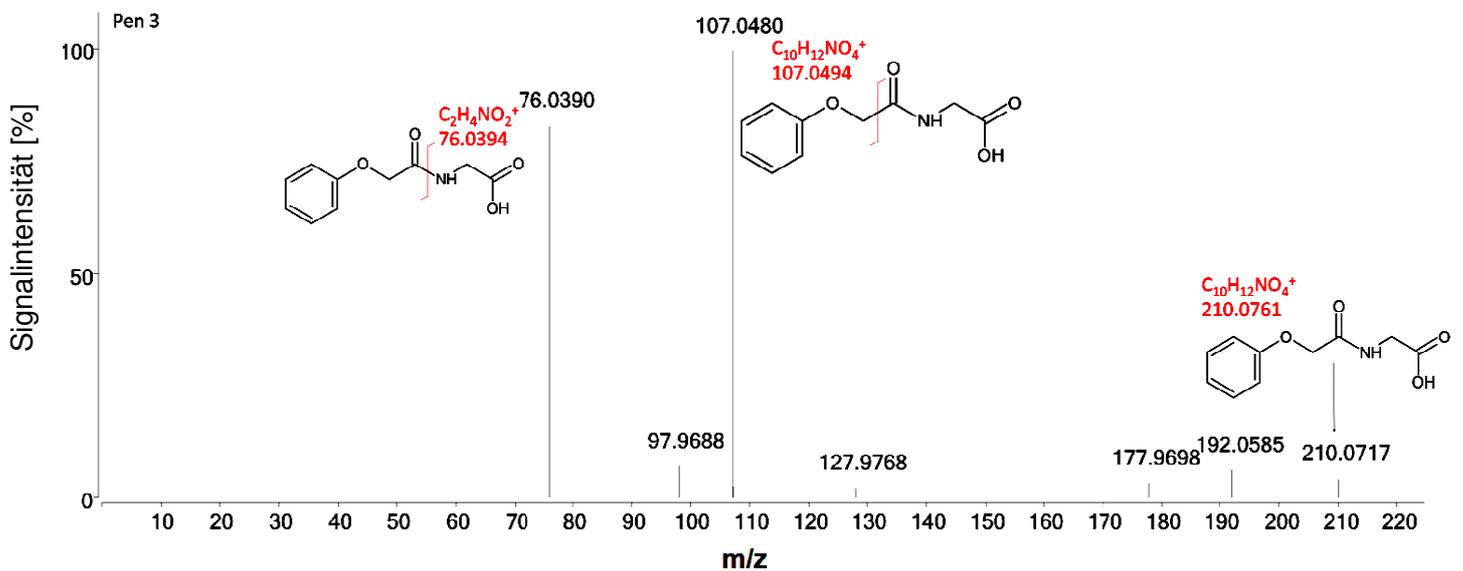


Abb. Anhang 19: QToF-Spektrum von PEN TP3.

Anhang

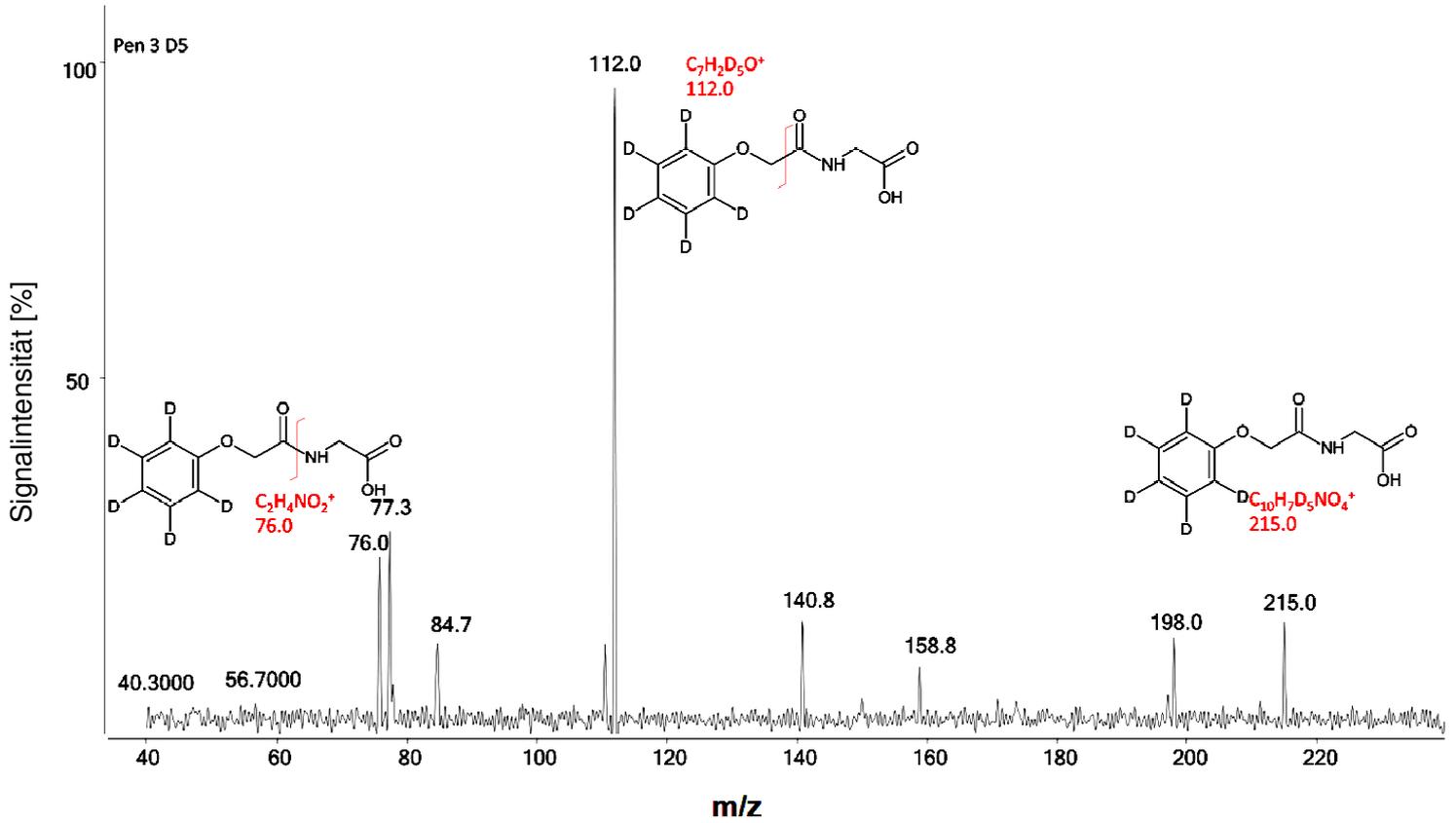


Abb. Anhang 20: QqQ Spektrum von PEN TP3-D5.

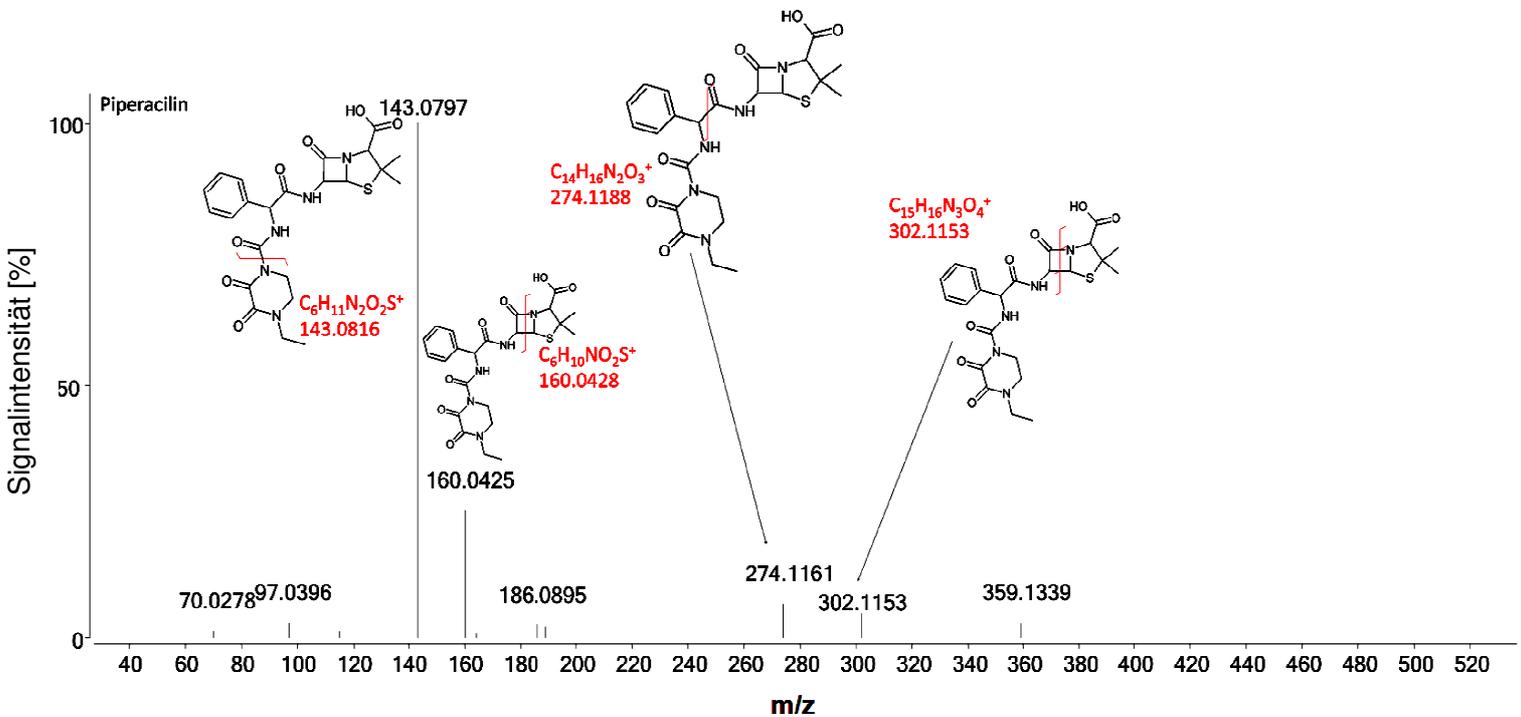


Abb. Anhang 21: QToF-Spektrum von PIP.

Anhang

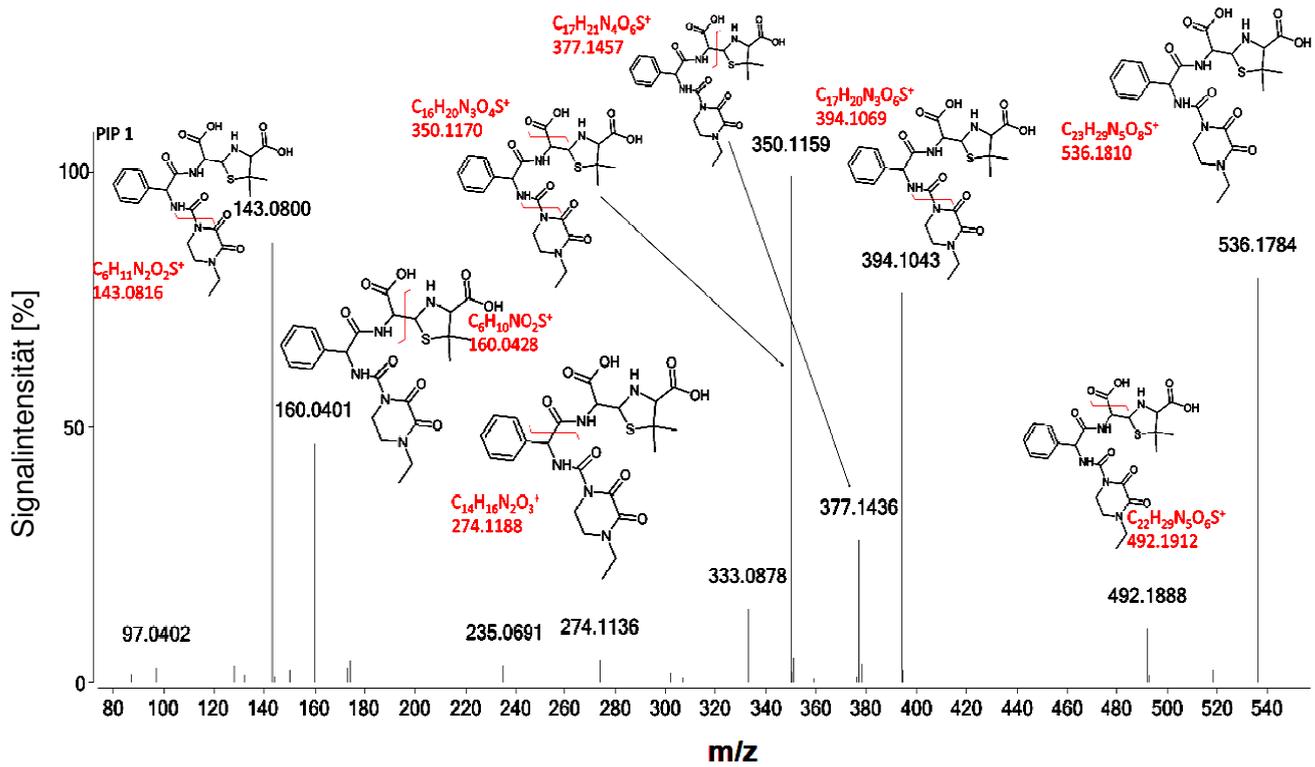


Abb. Anhang 22: QToF-Spektrum von PIP TP1.

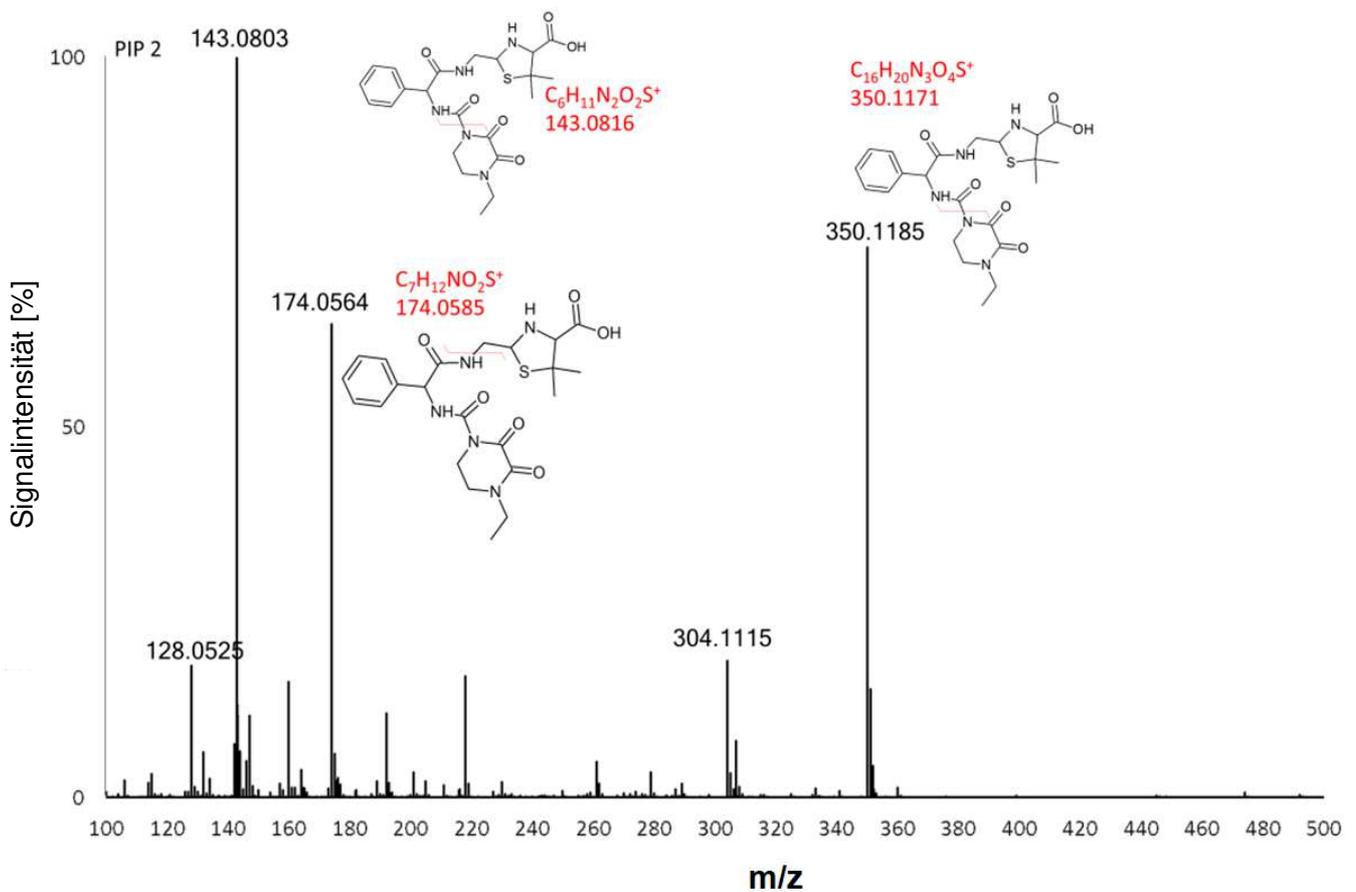


Abb. Anhang 23: QToF-Spektrum von PIP TP2.

Anhang

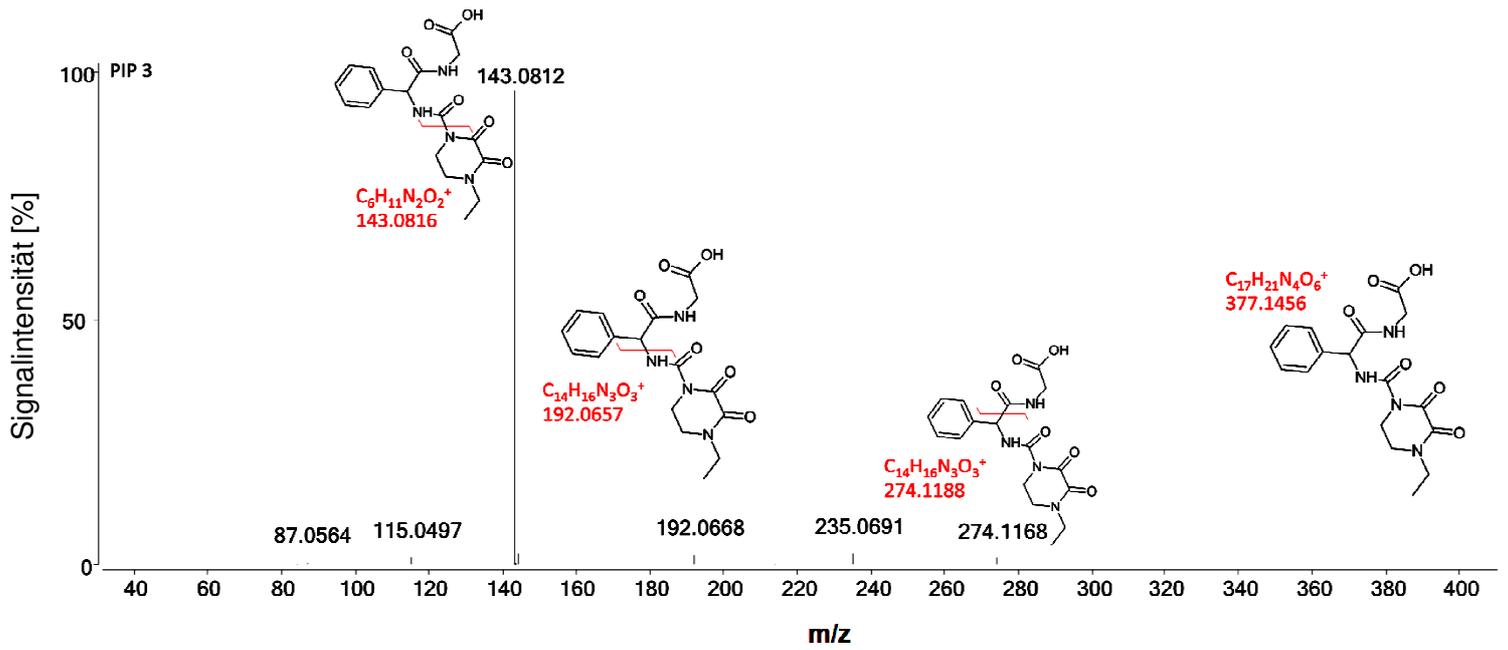


Abb. Anhang 24: QToF-Spektrum von PIP TP3.

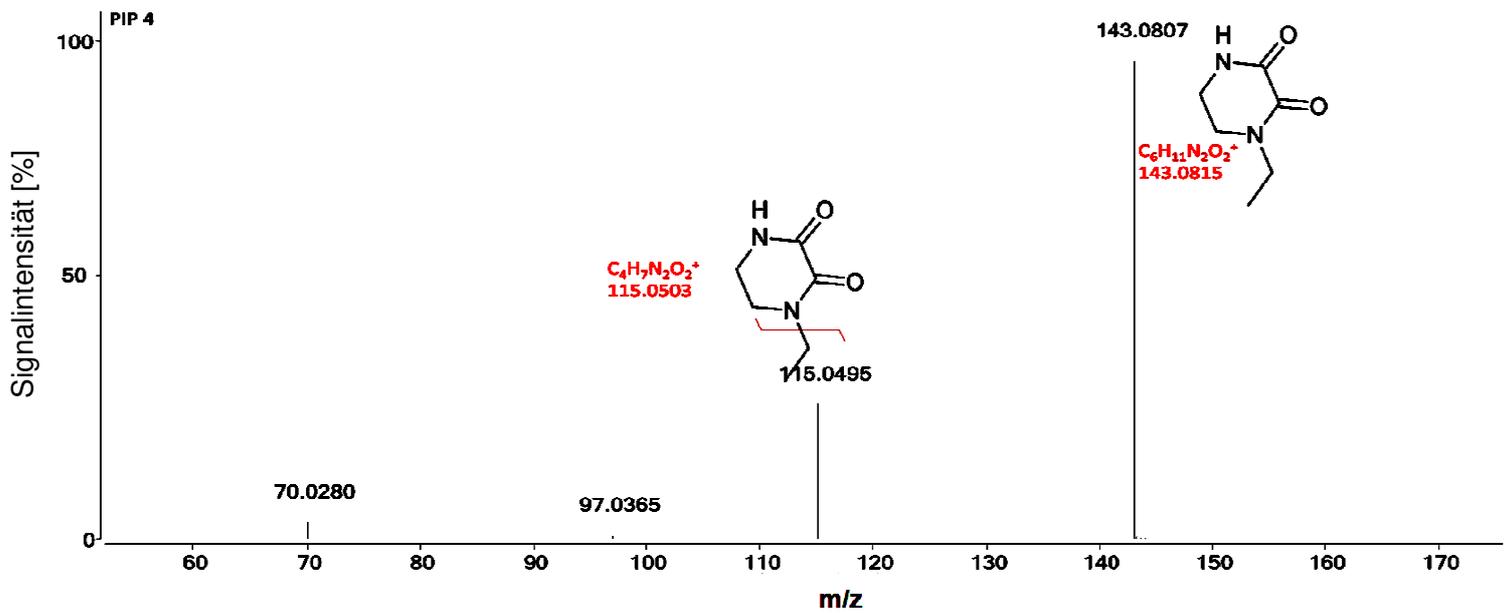
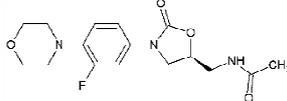
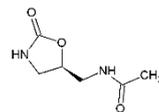
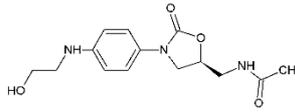
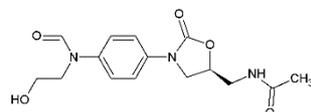
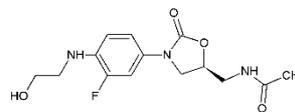
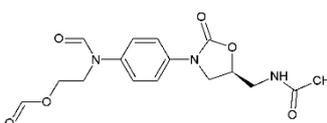
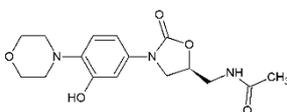
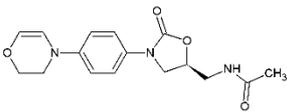


Abb. Anhang 25: QToF-Spektrum von PIP TP4.

Tab. Anhang 4: Konzentration von PEN TP1 und PIP TP4
Während der Bestrahlung durch simuliertes Sonnenlicht.

Bestrahlung [h]	PEN TP1 [ng/L]	PIP TP4 [ng/L]
0	0,0	0,0
1	157,7 ± 69,2	43,6 ± 12,7
2	160,4 ± 53,6	53,6 ± 14,9
3	140,0 ± 38,6	67,6 ± 15,3
4	149,3 ± 26,0	80,6 ± 8,4
6	100,8 ± 15,3	103,4 ± 3,4
8	108,8 ± 37,6	118,0 ± 1,3
12	38,5 ± 19,7	125,7 ± 12,5
24	4,4 ± 4,4	91,4 ± 26,6

Tab. Anhang 5: Übersicht über die TPs von LIN.

TP	t _R	m/z	Strukturvorschlag
			C₁₆H₂₀FN₃O₄
Lin	3,04	338,1516	<i>N</i> -{[(5 <i>S</i>)-3-[3-fluoro-4-(morpholin-4-yl)phenyl]-2-oxo-1,3-oxazolidin-5-yl] methyl} acetamid 
			C₆H₁₀N₂O₃
Lin TP1	0,46	159,0764	<i>N</i> -{[(5 <i>S</i>)-2-oxo-1,3-oxazolidin-5-yl] methyl} acetamid 
			C₁₄H₁₉N₃O₄
Lin TP2	1,32	294,1446	<i>N</i> -{[(5 <i>S</i>)-3-[4-[(2-hydroxyethyl) amino]phenyl]-2-oxo-1,3-oxazolidin-5-yl] methyl} acetamid 
			C₁₅H₁₉N₃O₅
Lin TP3	1,61	322,1391	<i>N</i> -{[(5 <i>S</i>)-3-[4-[formyl (2-hydroxyethyl) amino]phenyl]-2-oxo-1,3-oxazolidin-5-yl] methyl} acetamid 
			C₁₄H₁₈FN₃O₄
Lin TP4	1,96	312,1357	<i>N</i> -{[(5 <i>S</i>)-3-[3-fluoro-4-[(2-hydroxyethyl) amino]phenyl]-2-oxo-1,3-oxazolidin-5-yl] methyl} acetamid 
			C₁₆H₁₉N₃O₆
Lin TP5	2,00	350,1350	2-[4-[(5 <i>S</i>)-5-(acetamidomethyl)-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]phenyl] (formyl) amino ethyl formiat 
			C₁₆H₂₁N₃O₅
Lin TP6	2,15	336,1554	<i>N</i> -{[(5 <i>S</i>)-3-[3-hydroxy-4-(morpholin-4-yl)phenyl]-2-oxo-1,3-oxazolidin-5-yl] methyl} acetamid 
			C₁₆H₁₉N₃O₄
Lin TP7	2,34 2,42	318,1445	<i>N</i> -{[(5 <i>S</i>)-3-[4-(2,3-dihydro-4 <i>H</i> -1,4-oxazin-4-yl)phenyl]-2-oxo-1,3-oxazolidin-5-yl] methyl} acetamid 

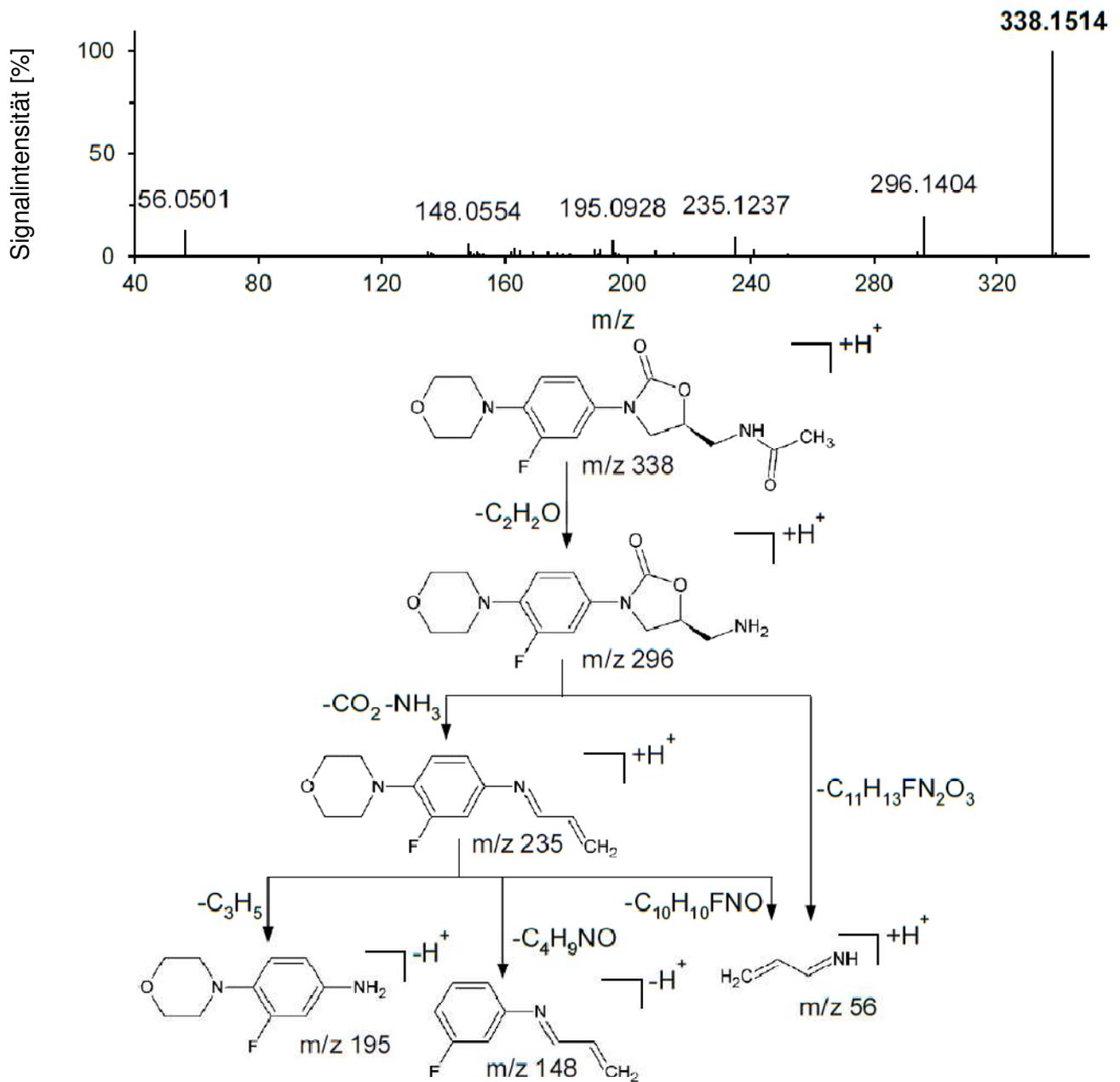


Abb. Anhang 26: QToF-Spektrum von LIN.

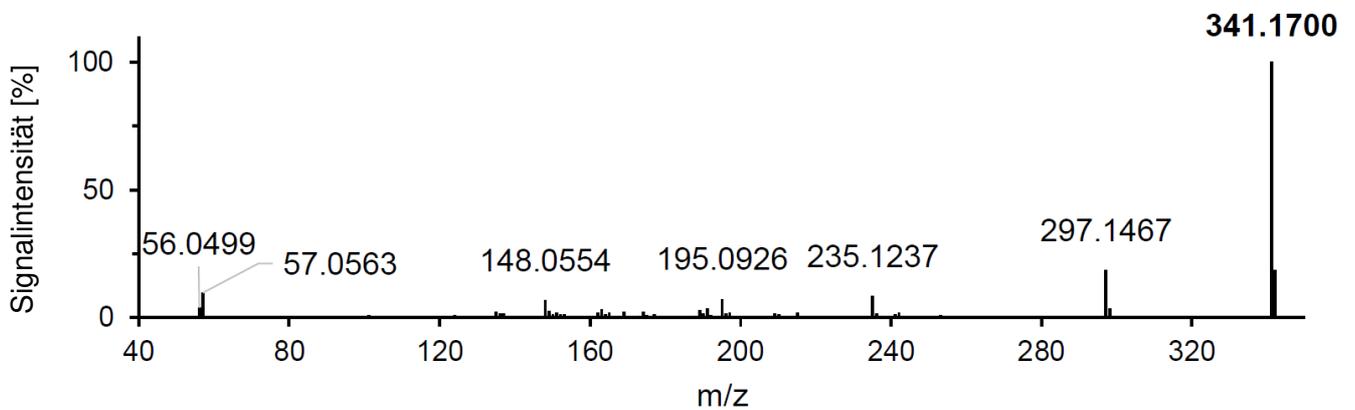


Abb. Anhang 27: QToF-Spektrum von LIN-D3.

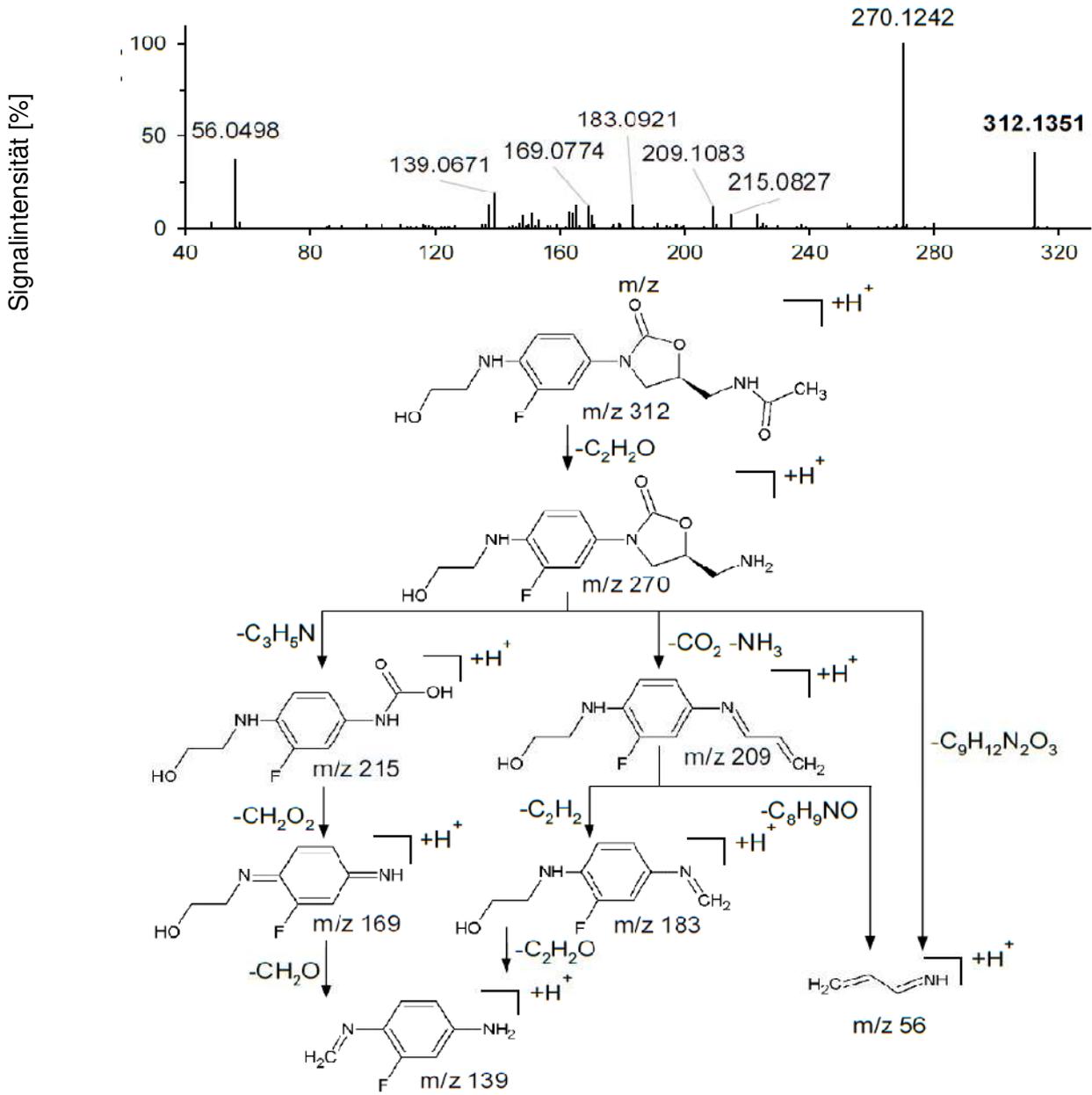


Abb. Anhang 28: QToF-Spektrum von LIN TP1.

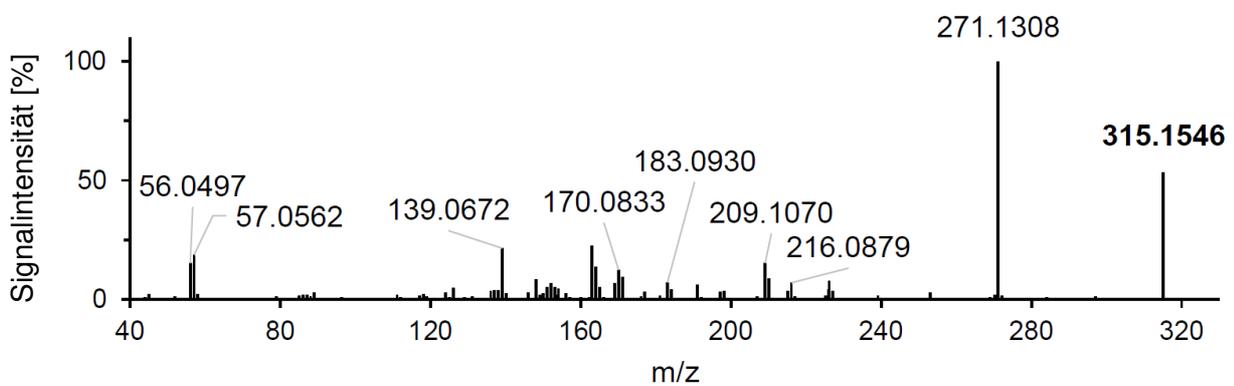


Abb. Anhang 29: QToF-Spektrum von LIN TP1-D3.

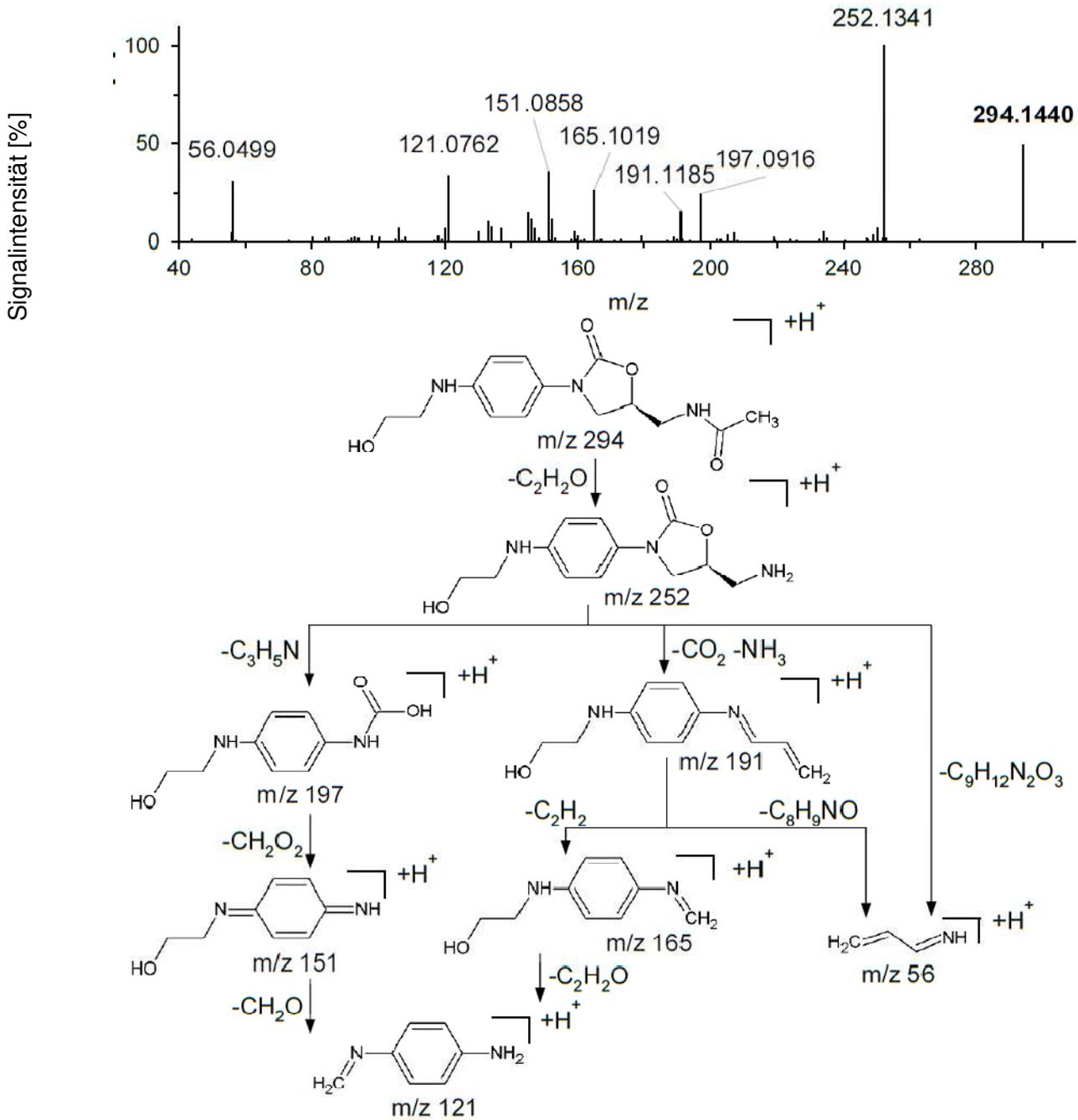


Abb. Anhang 30: QToF-Spektrum von LIN TP2.

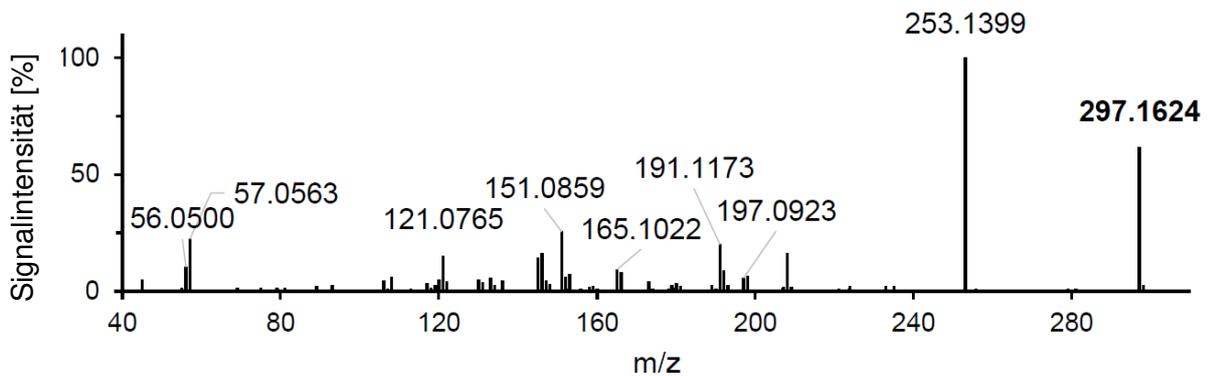
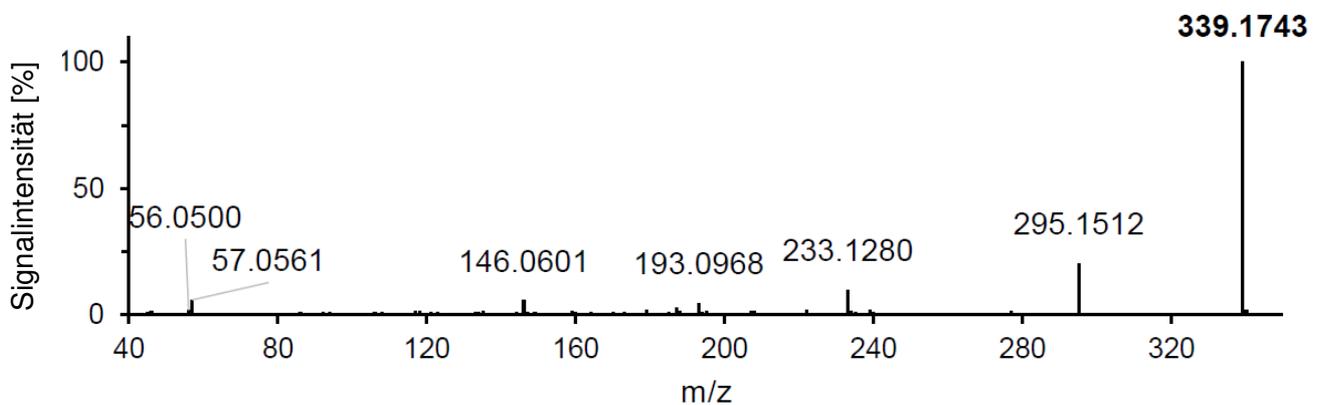
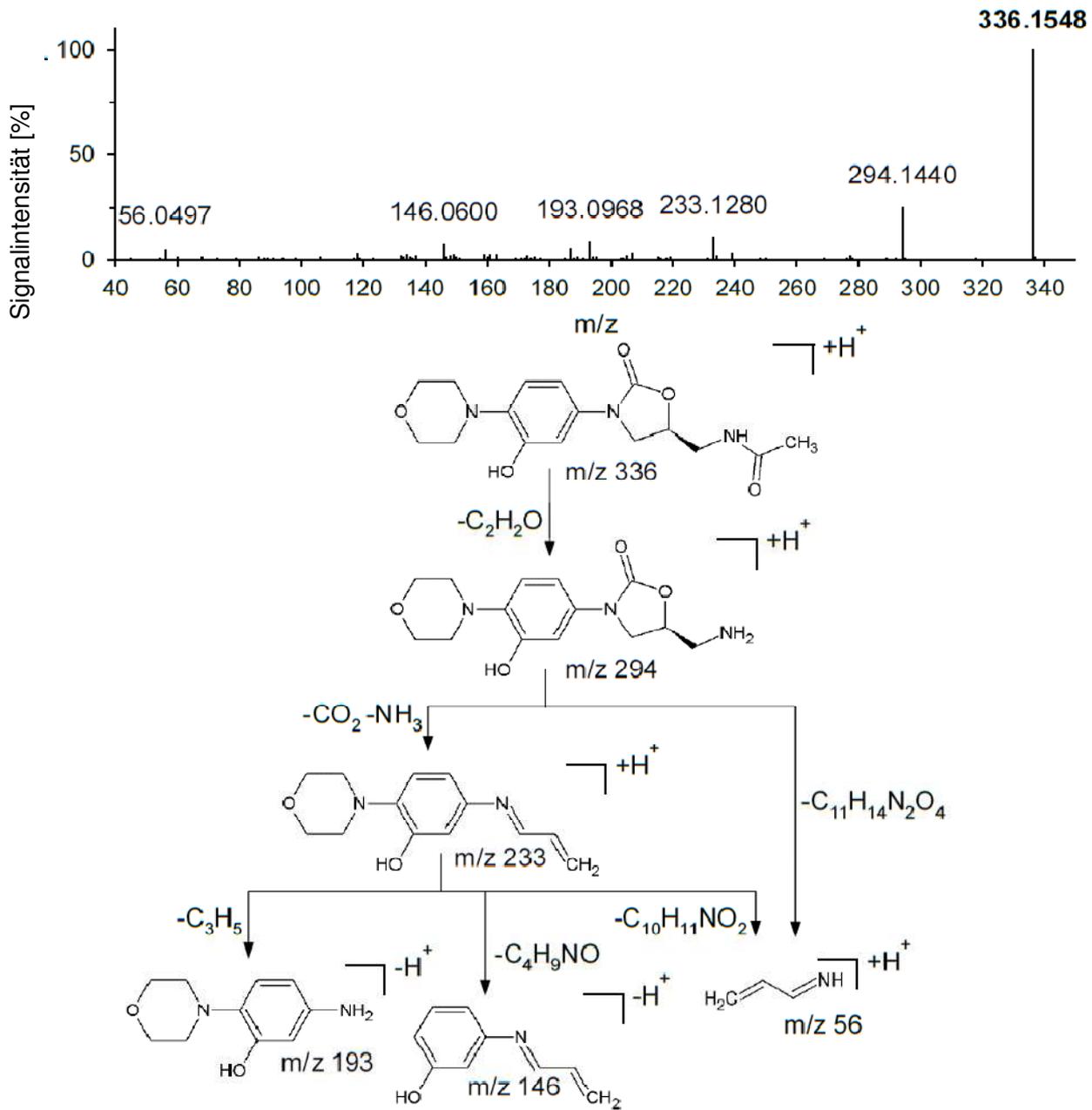


Abb. Anhang 31: QToF-Spektrum von LIN TP2-D3.



Signalintensität [%]

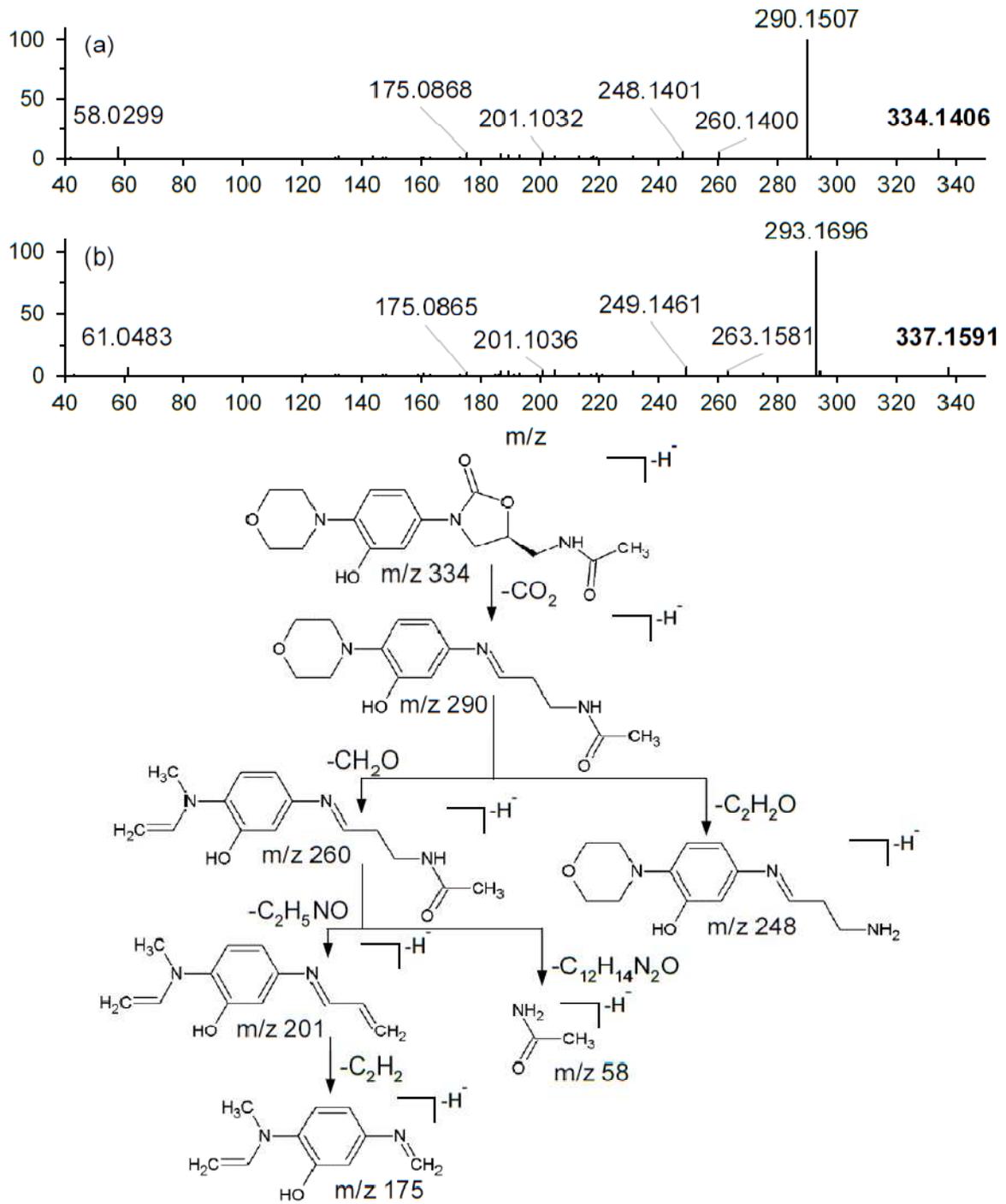


Abb. Anhang 34: QToF (-) Spektrum von a: LIN TP3 und b: LIN TP3-D3.

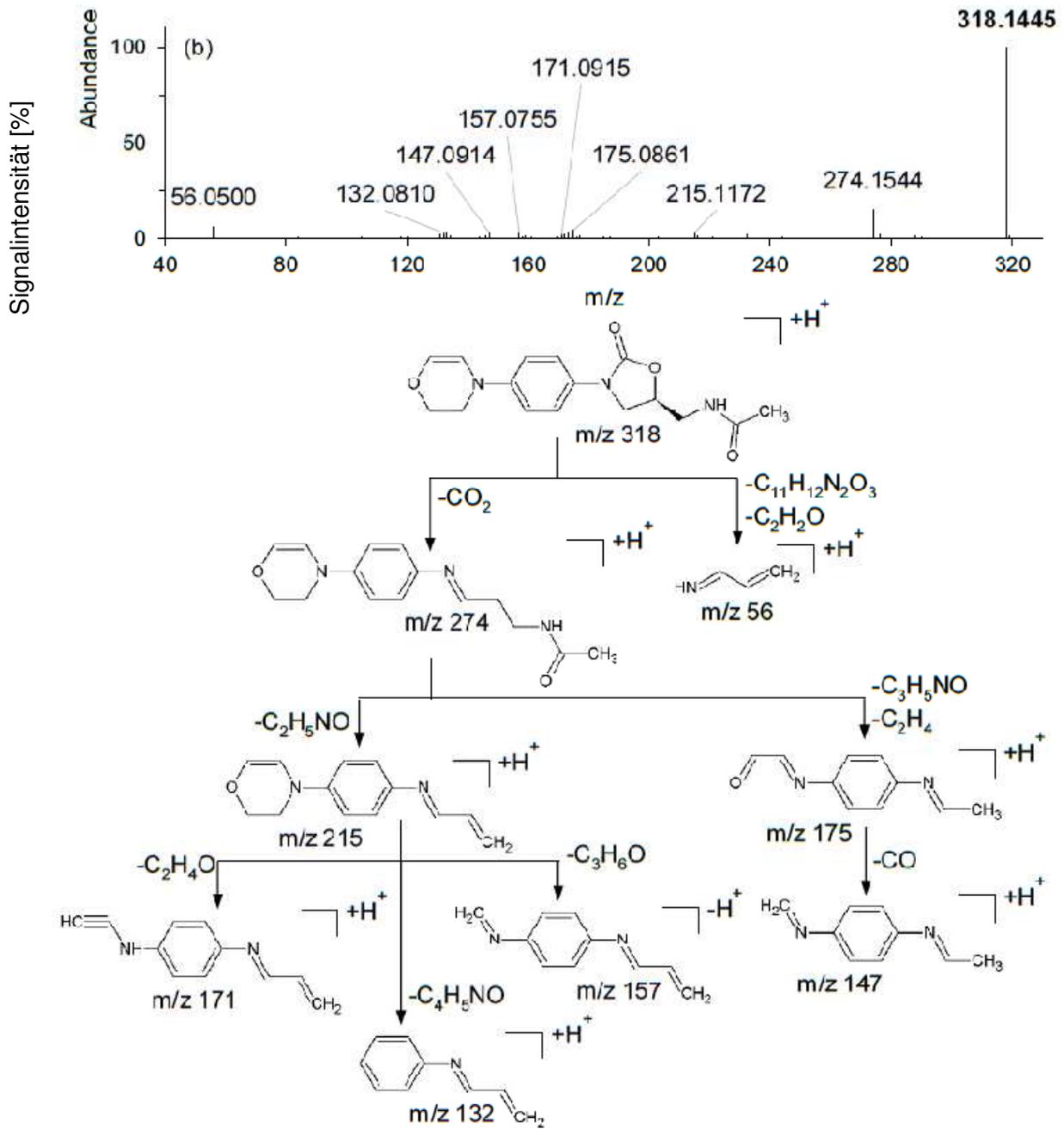


Abb. Anhang 35: QToF-Spektrum von LIN TP4.

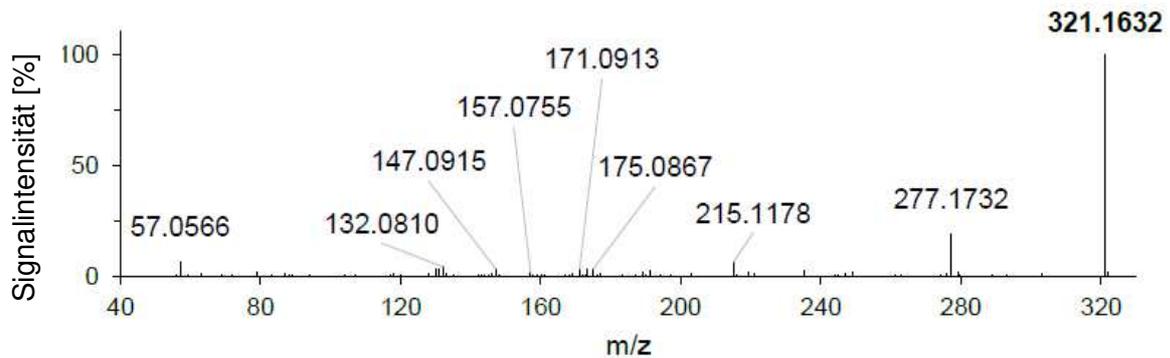


Abb. Anhang 36: QToF-Spektrum von LIN TP4-D3.

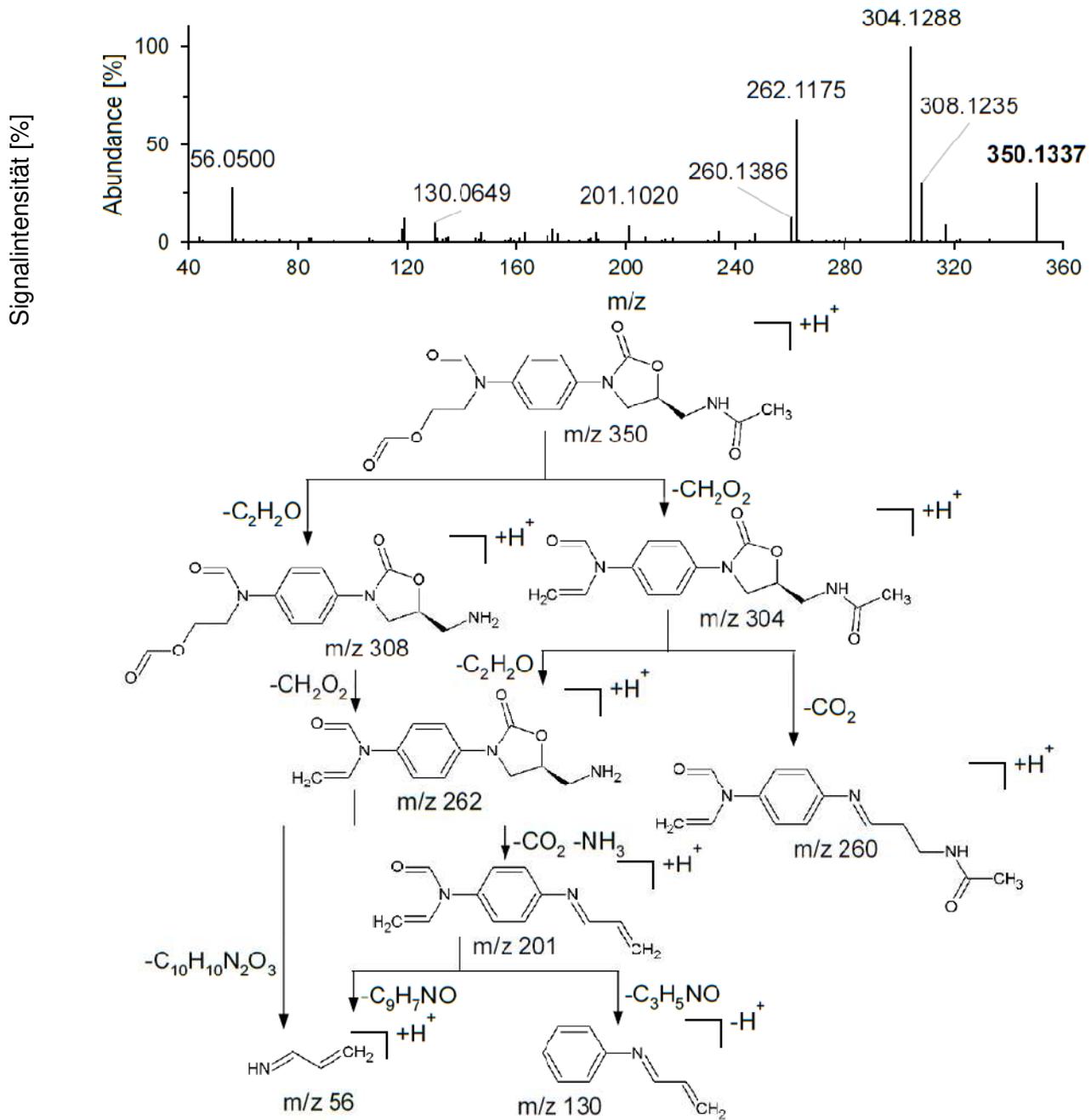


Abb. Anhang 37: QToF-Spektrum von LIN TP5.

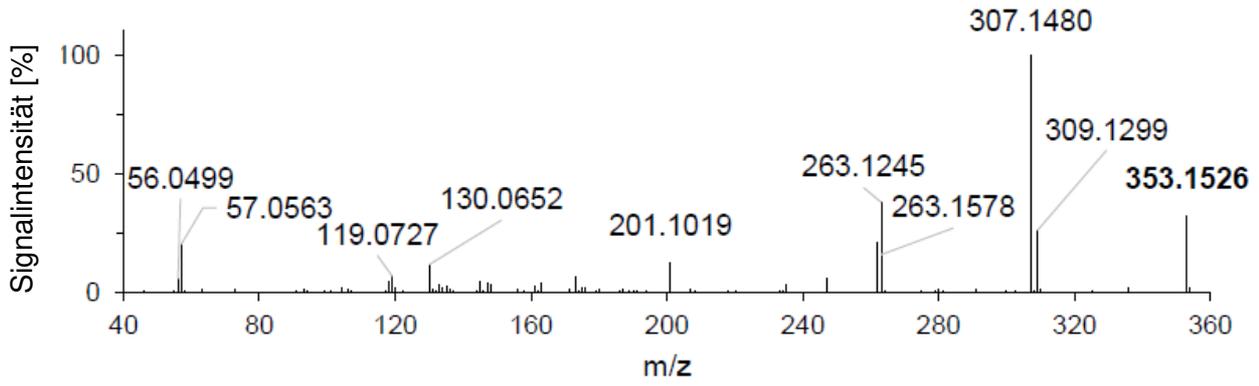


Abb. Anhang 38: QToF-Spektrum von LIN TP5-D3.

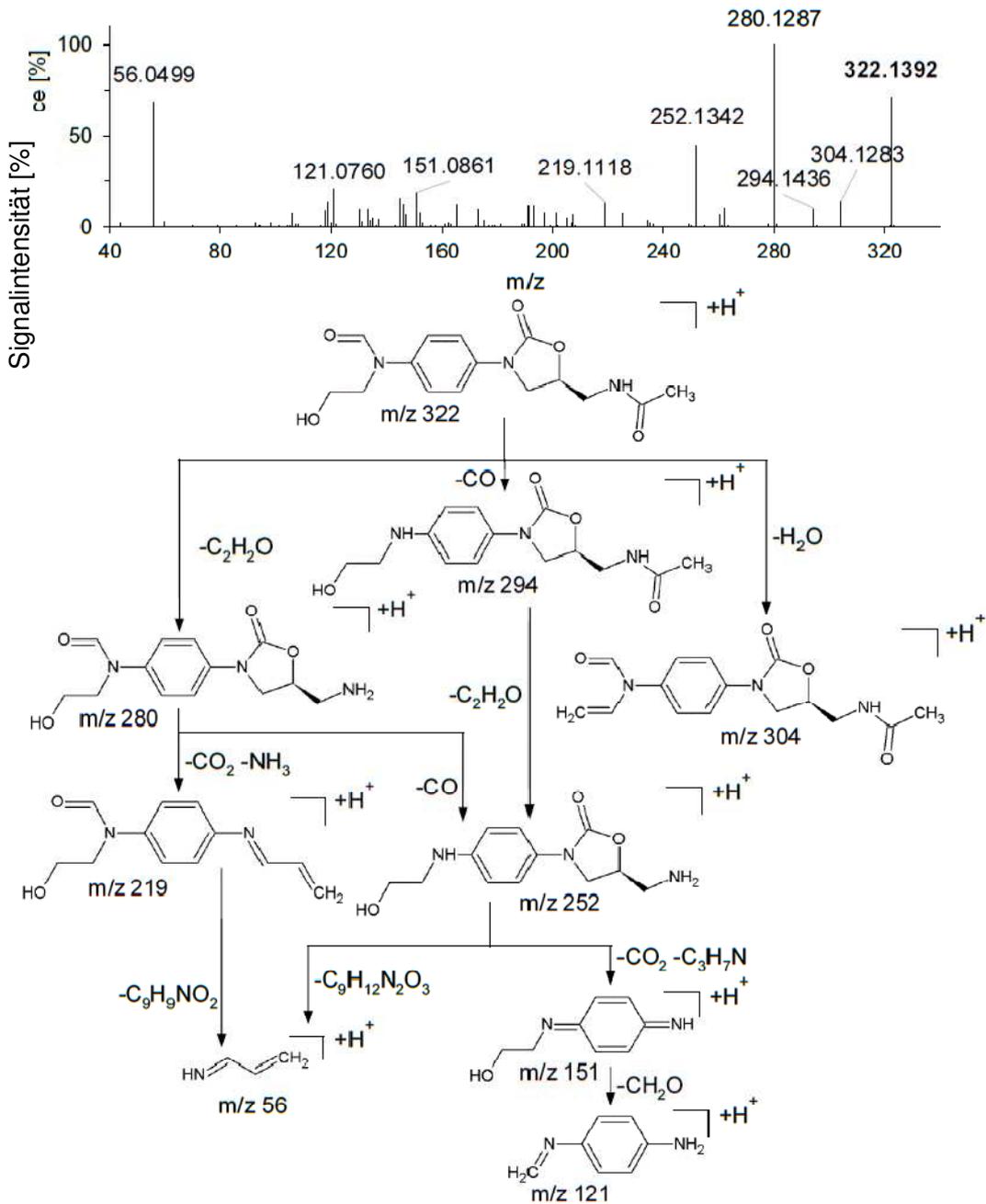


Abb. Anhang 39: QToF-Spektrum von LIN TP6.

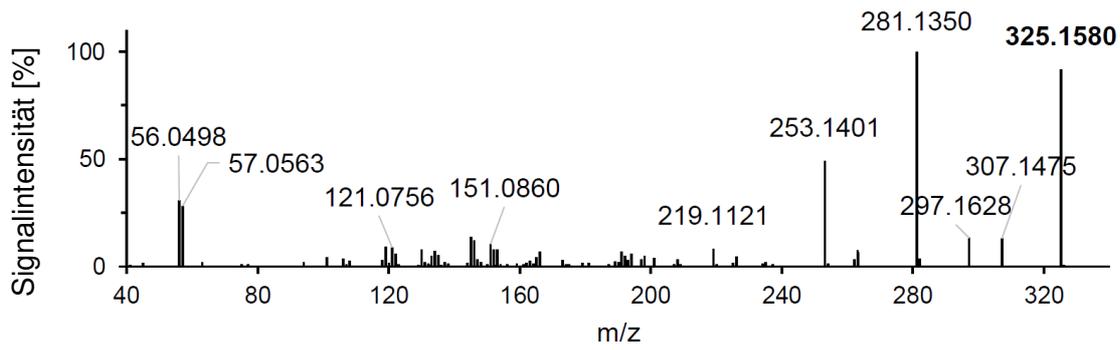


Abb. Anhang 40: QToF-Spektrum von LIN TP6-D3.

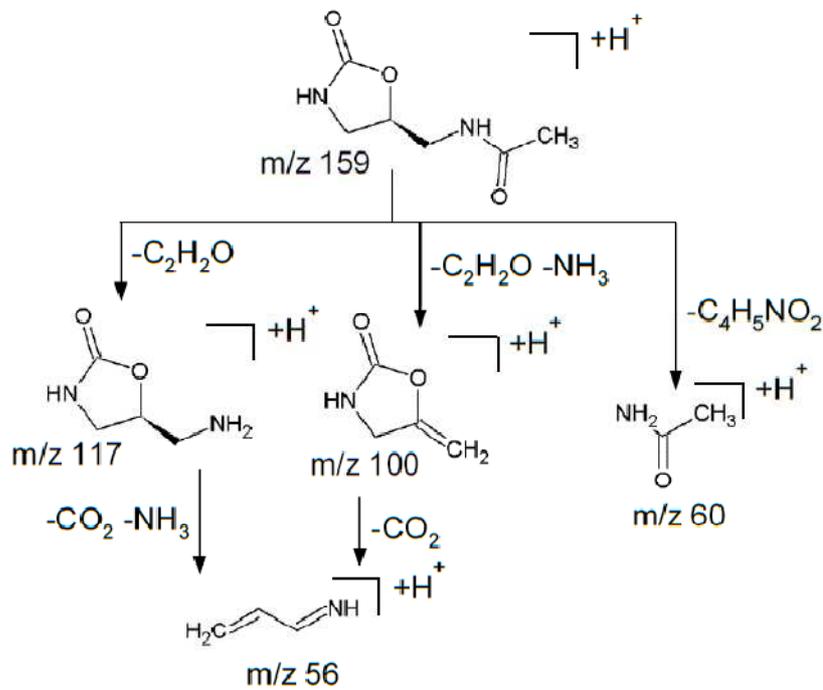
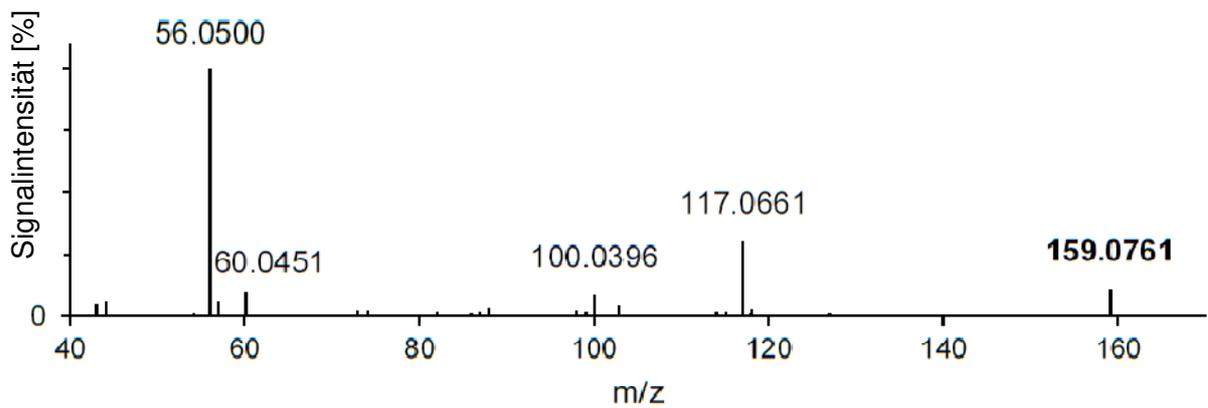


Abb. Anhang 41: QToF-Spektrum von LIN TP7.

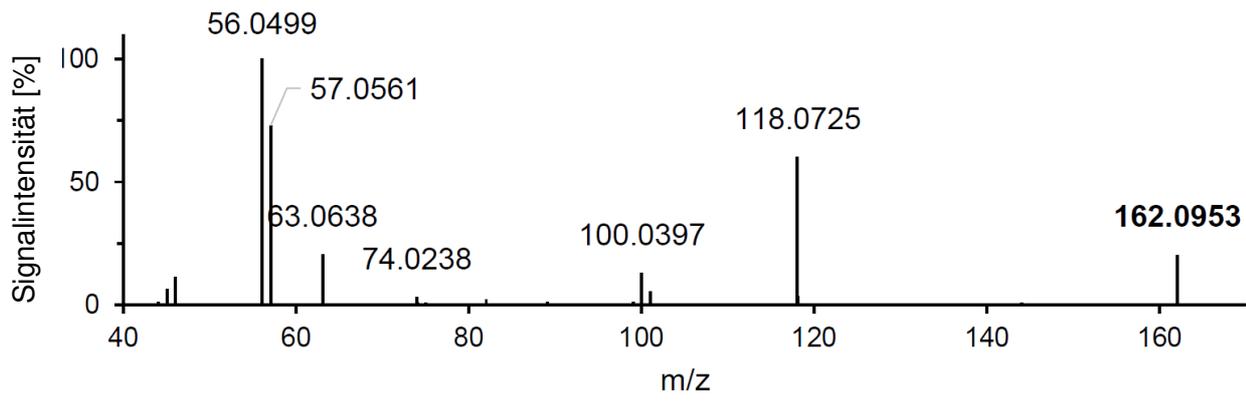
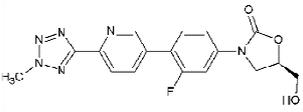
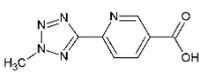
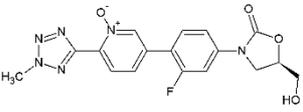
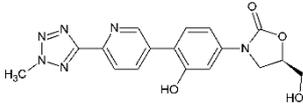
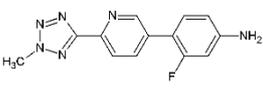
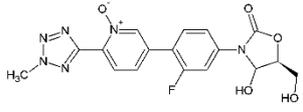


Abb. Anhang 42: QToF-Spektrum von LIN TP7-D3.

Tab. Anhang 6: Übersicht über die TPs von TED.

TP	t _R	m/z	Strukturvorschlag
Ted	3,75	371,1263	<p>$C_{17}H_{15}FN_6O_3$</p> <p>(5R)-3-{3-fluoro-4-[6-(2-methyl-2H-tetrazol-5-yl) pyridin-3-yl] phenyl}-5-(hydroxymethyl)-1,3-oxazolidin-2-on</p> 
Ted TP1	2,10	206,0670	<p>$C_8H_7N_5O_2$</p> <p>6-(2-methyl-2H-tetrazol-5-yl) pyridin-3-carboxylsäure</p> 
Ted TP2	3,09 3,35	387,1218	<p>$C_{17}H_{15}FN_6O_4$</p> <p>(5R)-3-{3-fluoro-4-[6-(2-methyl-2H-tetrazol-5-yl)-1-oxo-1λ⁵-pyridin-3-yl] phenyl}-5-(hydroxymethyl)-1,3-oxazolidin-2-on</p> 
Ted TP3	3,35	369,1309	<p>$C_{17}H_{16}N_6O_4$</p> <p>(5R)-5-(hydroxymethyl)-3-{3-hydroxy-4-[6-(2-methyl-2H-tetrazol-5-yl) pyridin-3-yl] phenyl}-1,3-oxazolidin-2-on</p> 
Ted TP4	3,67	271,1100	<p>$C_{13}H_{11}FN_6$</p> <p>4-[6-(2-methyl-2H-tetrazol-5-yl) pyridin-3-yl] aniline</p> 
Ted TP5	3,84	403,1158	<p>$C_{17}H_{15}FN_6O_5$</p> <p>(5S)-3-{3-fluoro-4-[6-(2-methyl-2H-tetrazol-5-yl)-1-oxo-1λ⁵-pyridin-3-yl] phenyl}-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-1,3-oxazolidin-2-on</p> 

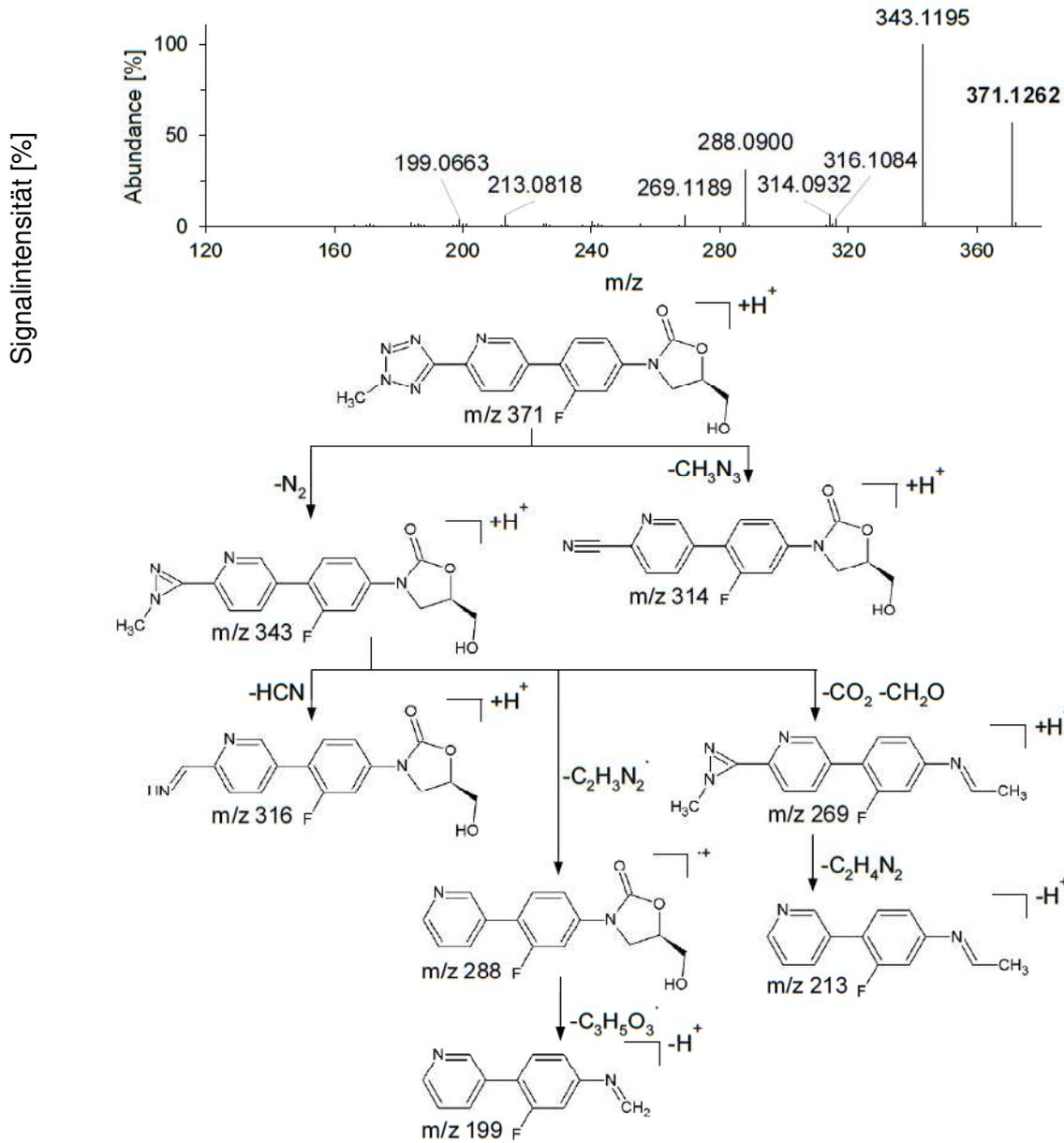


Abb. Anhang 43: QToF-Spektrum von TED.

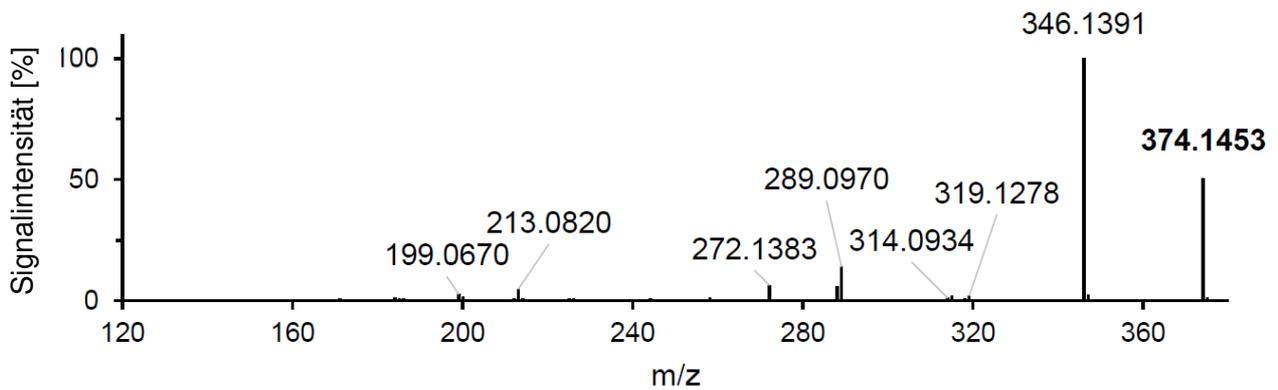


Abb. Anhang 44: QToF-Spektrum von TED-D3.

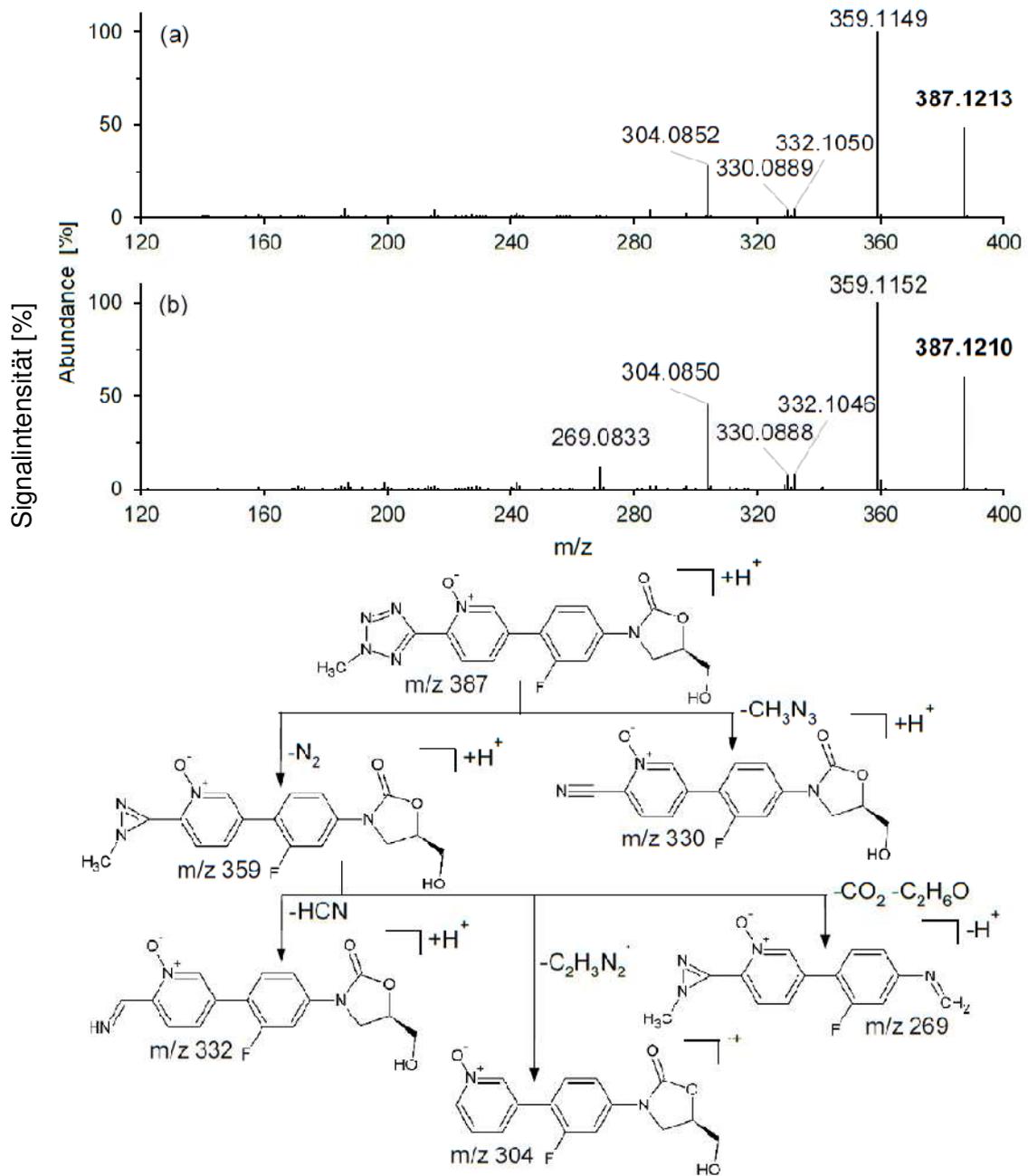


Abb. Anhang 45: QToF-Spektrum von TED TP1a und TP1b.

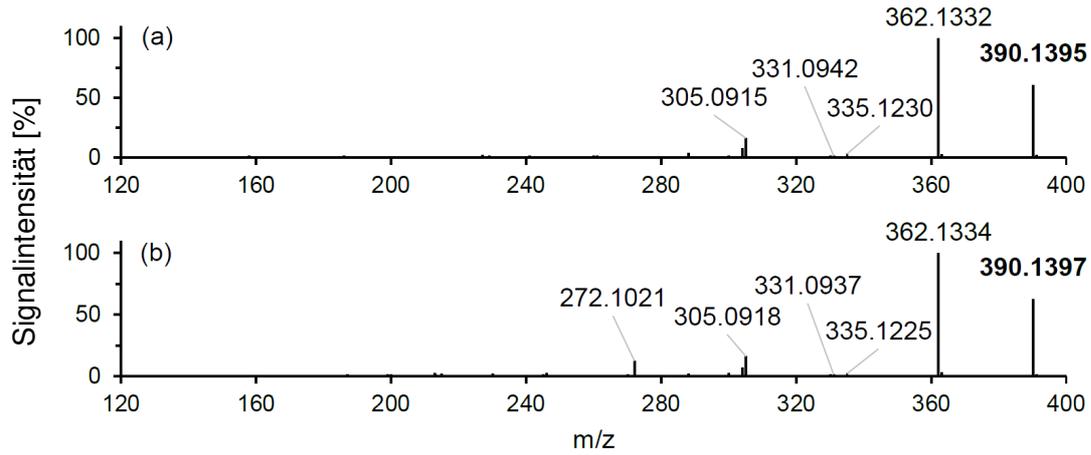


Abb. Anhang 46: QToF-Spektrum von TED TP1a-b -D3.

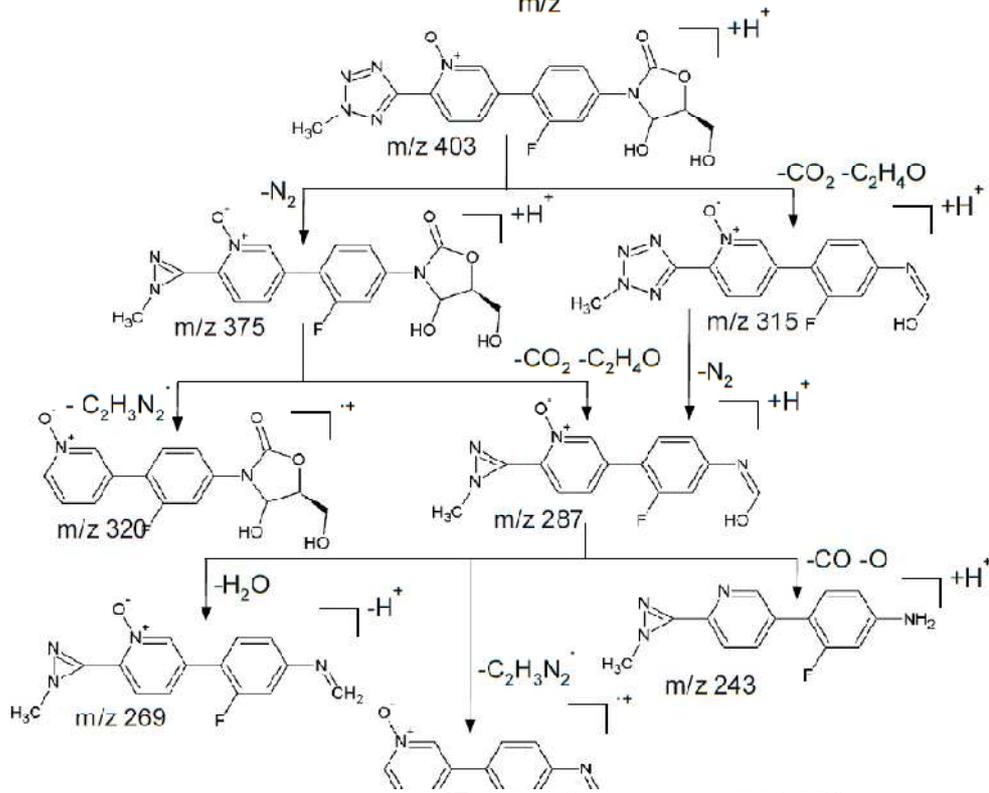
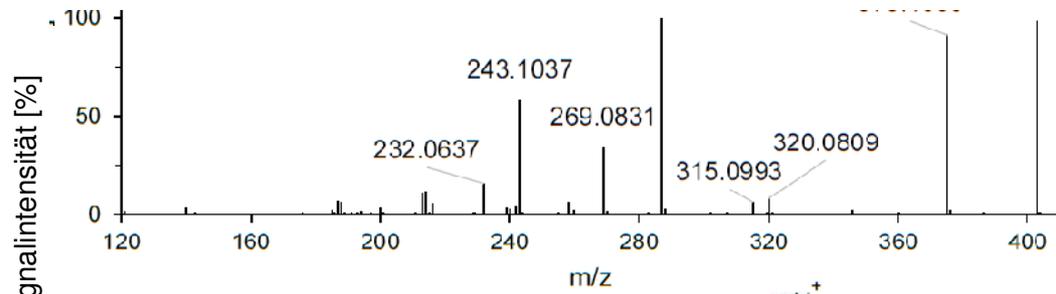


Abb. Anhang 47: QToF-Spektrum von TED TP2.

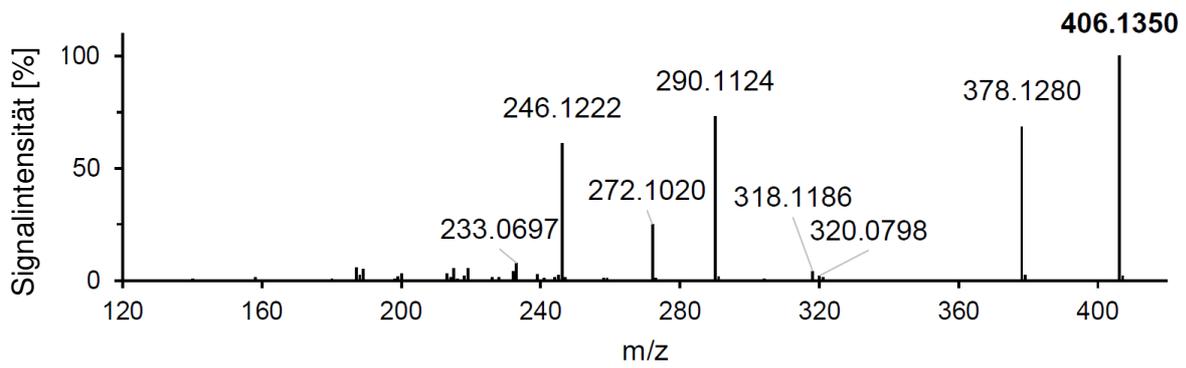


Abb. Anhang 48: QToF-Spektrum von TED TP2-D3.

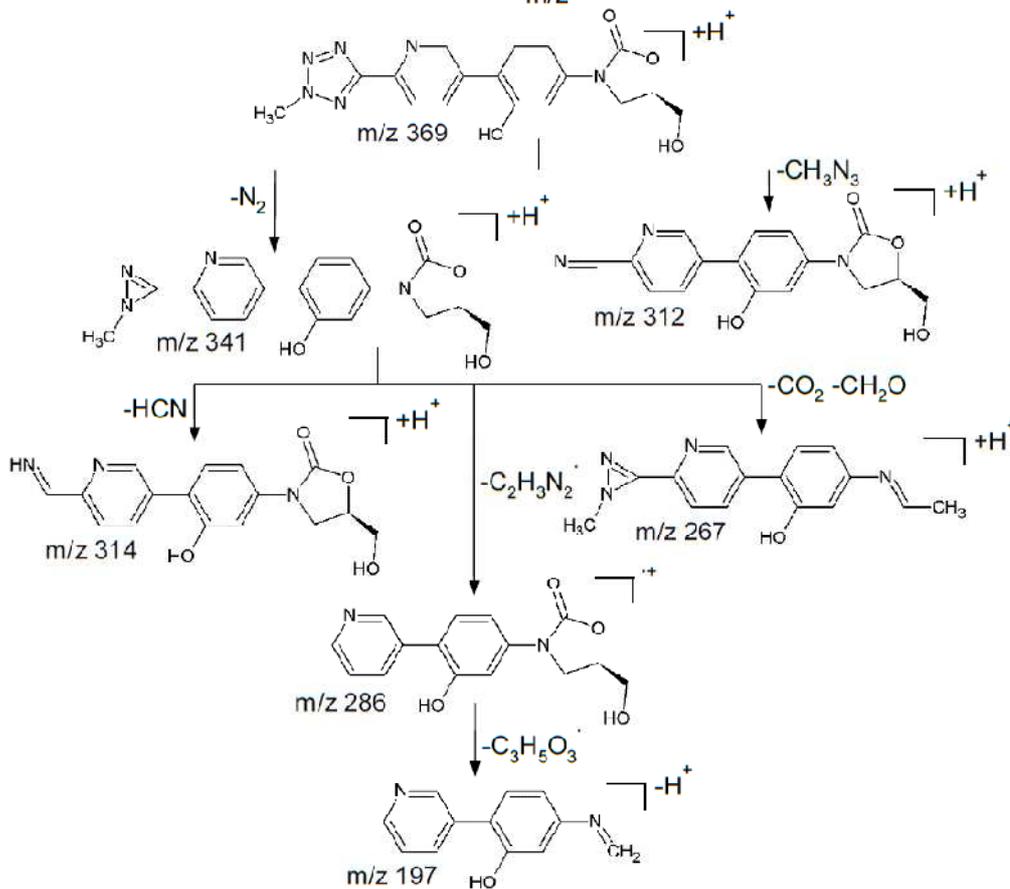
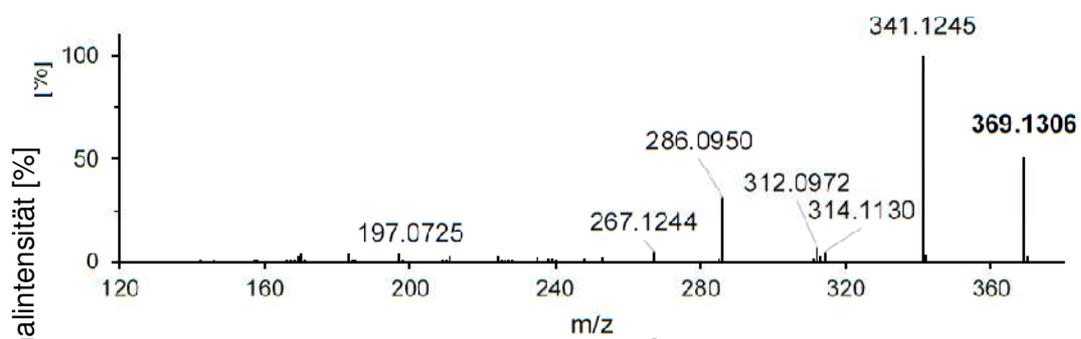


Abb. Anhang 49: QToF-Spektrum von TED TP3.

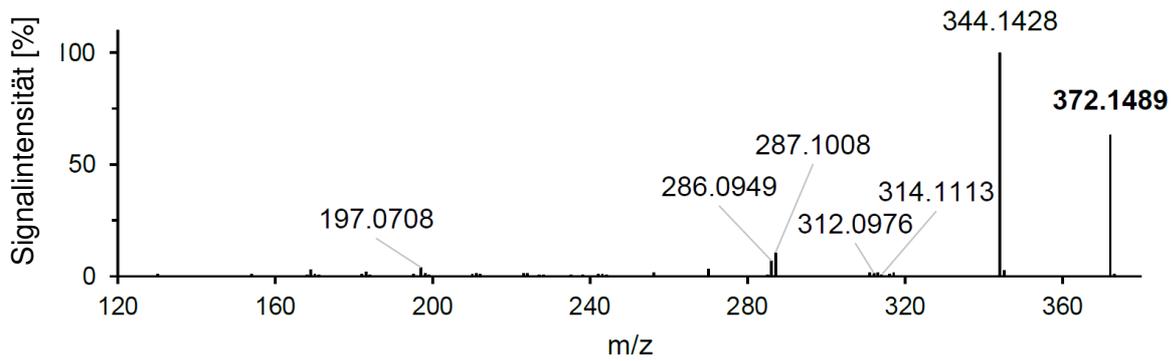


Abb. Anhang 50: QToF-Spektrum von TED TP3-D3.

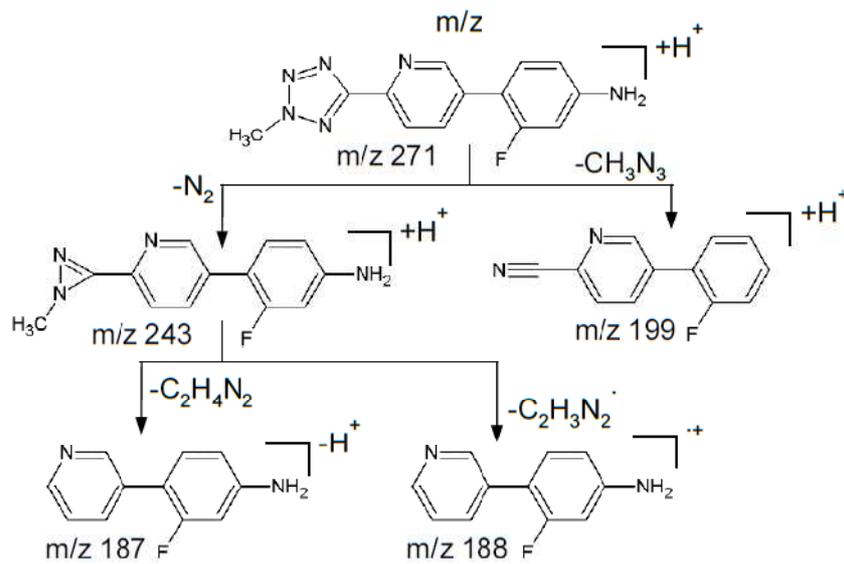
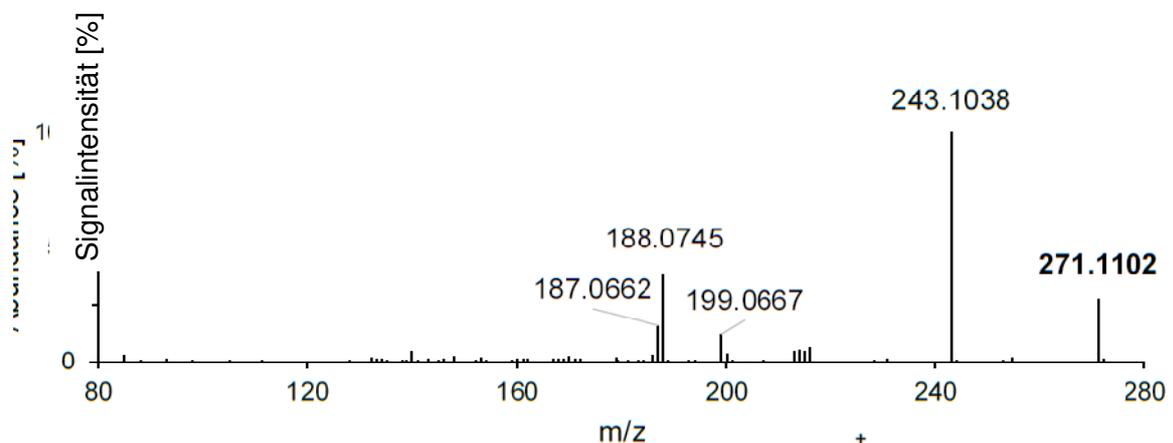


Abb. Anhang 51: QToF-Spektrum von TED TP4.

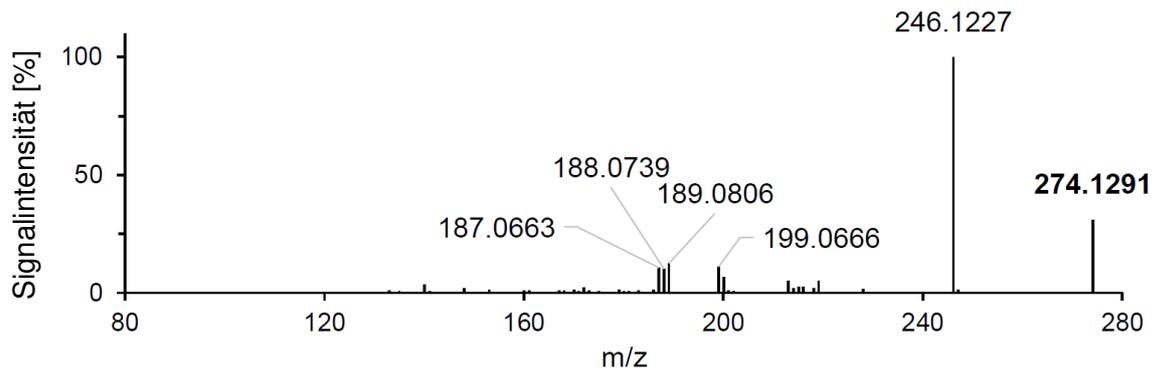


Abb. Anhang 52: QToF-Spektrum von TED TP4-D3.

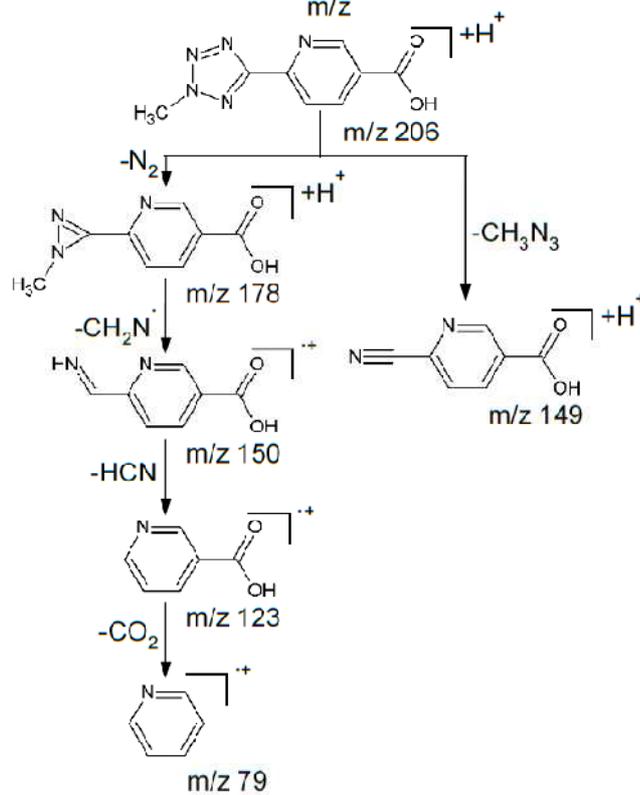
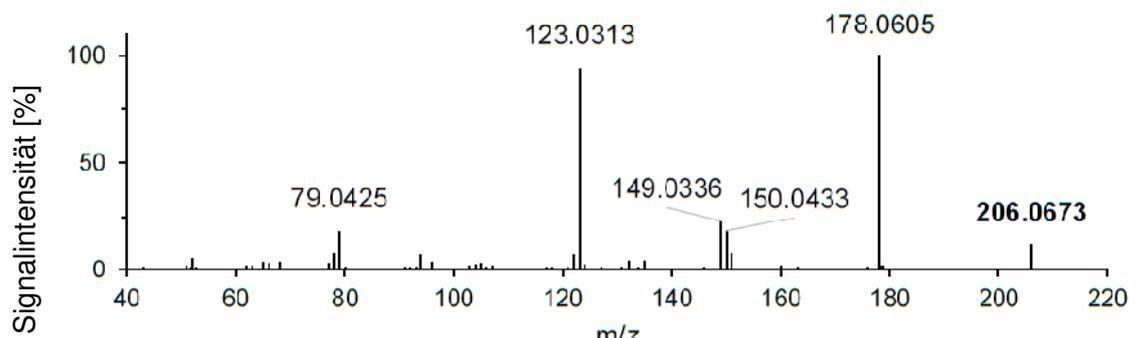


Abb. Anhang 53: QToF-Spektrum von TED TP5.

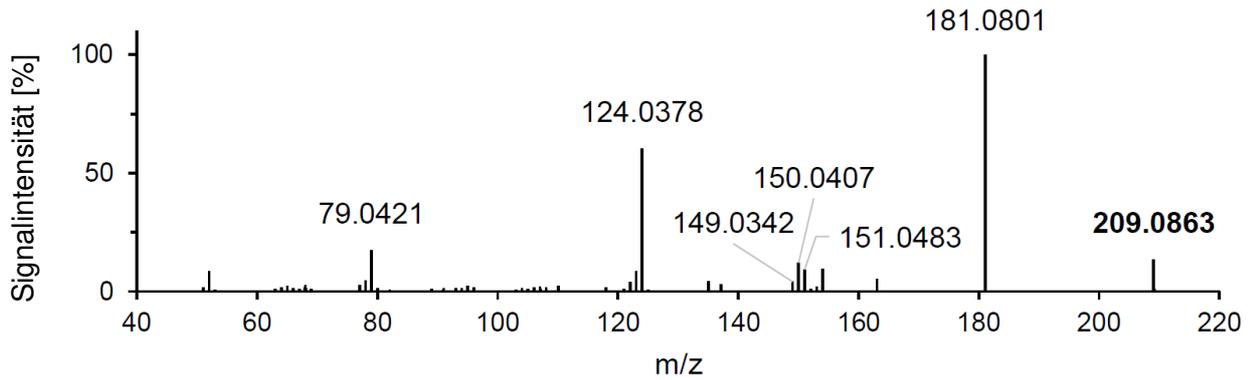


Abb. Anhang 54: QToF-Spektrum von TED TP5-D3.

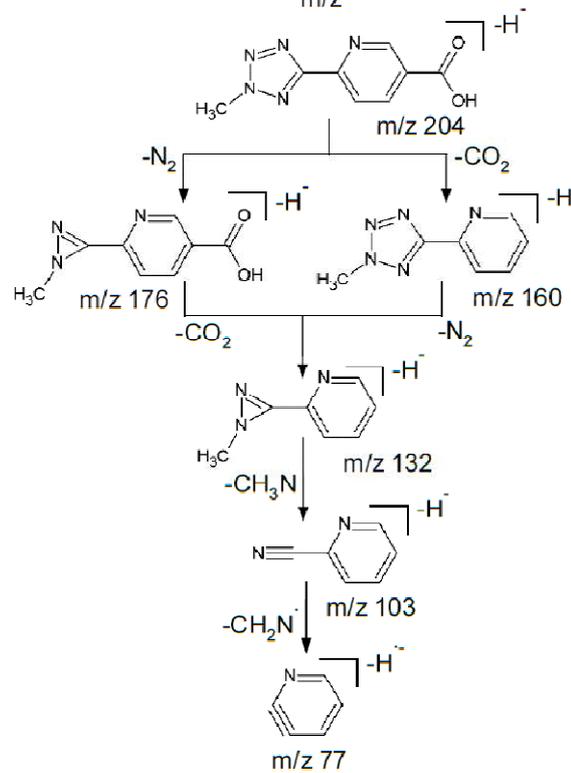
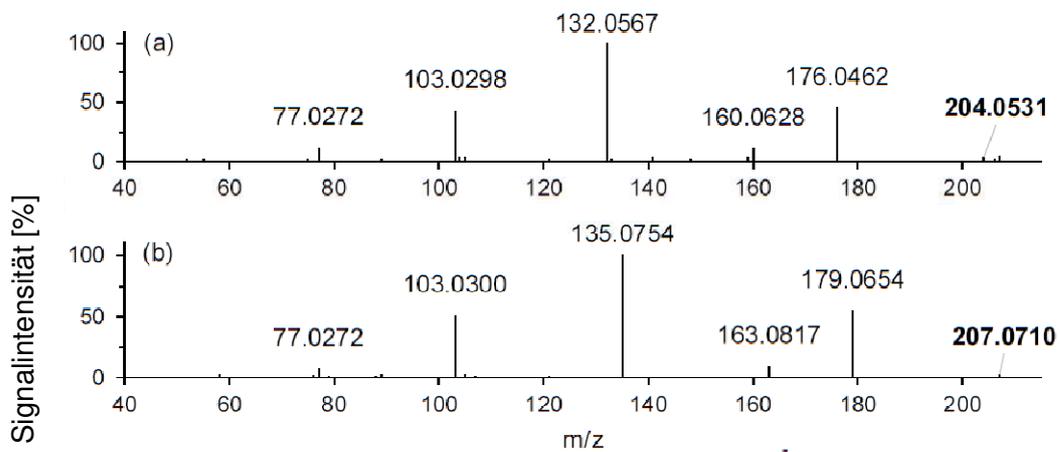


Abb. Anhang 55: QToF (-) Spektrum von a: TED TP5 und b: TED TP5 -D3.

Tab. Anhang 7: Wachstumshemmung von *Bacillus subtilis* durch bestrahltes AMX.

Verdünnung [%]	AMX t ₀	AMX t _{1/4}	AMX t _{1/16}	AMX t _{1/64}
50% (5 mg/L)	100 ± 0,2	100 ± 0	100 ± 0,2	100 ± 0,3
25	100 ± 0	100 ± 0,1	100 ± 0,1	94 ± 0,7
12,5	100 ± 0,1	100 ± 0,2	99 ± 0,1	43 ± 1,9
6,25	99 ± 0,3	99 ± 0,3	75 ± 1,1	28 ± 7,4
3,12	100 ± 0,1	96 ± 0,4	46 ± 6,0	17 ± 8,7
1,56	99 ± 0,2	36 ± 19	25 ± 9,2	24 ± 5,8
0,78	92 ± 0,8	23 ± 3,1	9 ± 5,1	13 ± 7,4

Tab. Anhang 8: Wachstumshemmung von *Bacillus subtilis* durch bestrahltes AMP.

Verdünnung [%]	AMP t ₀	AMP t _{1/4}	AMP t _{1/16}	AMP t _{1/64}
50% (5 mg/L)	100 ± 0,2	100 ± 0,1	100 ± 0,3	100 ± 0,1
25	99 ± 0,5	99 ± 0,1	99 ± 0,3	98 ± 0,8
12,5	99 ± 0,4	99 ± 0,2	91 ± 9,9	58 ± 5,7
6,25	99 ± 0,5	100 ± 0,1	88 ± 0	45 ± 5,5
3,12	99 ± 1,2	97 ± 0,3	51 ± 1,2	39 ± 10,1
1,56	98 ± 1,7	64 ± 0,1	39 ± 21,7	35 ± 15,1
0,78	95 ± 1,4	44 ± 2,2	18 ± 12,4	12 ± 9,5
AMP TP3 (5 mg/L)	0 ± 0,0			

Tab. Anhang 9: Wachstumshemmung von *Bacillus subtilis* durch bestrahltes PEN.

Verdünnung [%]	PEN t ₀	PEN t _{1/4}	PEN t _{1/16}	PEN t _{1/64}
50% (5 mg/L)	99 ± 0,1	99 ± 0,1	99 ± 0,0	99 ± 0,4
25	98 ± 0,3	98 ± 0,0	98 ± 0,4	98 ± 0,4
12,5	98 ± 0,0	97 ± 0,2	96 ± 1,0	92 ± 1,2
6,25	93 ± 0,2	91 ± 1,3	81 ± 0,5	73 ± 4,2
3,12	73 ± 3,2	55 ± 6,1	46 ± 1,9	47 ± 4,8
1,56	48 ± 0,5	41 ± 1,1	49 ± 1,4	47 ± 6,3
0,78	40 ± 0,5	45 ± 0,4	47 ± 1,4	37 ± 6,4
PEN TP1 (5mg/L)	0 ± 0,0			

Tab. Anhang 10: Wachstumshemmung von *Bacillus subtilis* durch bestrahltes PEN.

Verdünnung [%]	PIP t_0	PIP $t_{1/4}$	PIP $t_{1/16}$	PIP $t_{1/64}$
50 (25 mg/L)	100 ± 0,0	99 ± 0,2	99 ± 0,3	99 ± 0,6
25	100 ± 0,6	98 ± 1,0	97 ± 3,3	68 ± 0,5
12,5	99 ± 0,9	99 ± 0,4	89 ± 0,4	34 ± 5,9
6,25	99 ± 0,2	93 ± 0,3	55 ± 0,5	29 ± 4,5
3,12	98 ± 0,4	54 ± 0,9	40 ± 0,5	25 ± 8,8
1,56	46 ± 7,4	40 ± 0,4	34 ± 2,2	23 ± 8,4
0,78	26 ± 5,5	23 ± 4,8	25 ± 0,8	25 ± 0,1
PIP TP4 (25 mg/L)	0 ± 0,0			

Tab. Anhang 11: Wachstumshemmung von *Bacillus subtilis* durch bestrahltes LIN.

Verdünnung [%]	Lin t_0	Lin $t_{1/4}$	Lin $t_{1/16}$	Lin $t_{1/64}$
50 (5 mg L ⁻¹)	84,0 ± 0,5	78,7 ± 1,0	71,6 ± 3,9	66,4 ± 0,6
25	78,8 ± 0,3	67,2 ± 1,5	67,6 ± 1,2	58,4 ± 6,9
12,5	72,3 ± 3,2	65,6 ± 3,5	56,5 ± 6,1	47,0 ± 3,9
6,25	67,5 ± 2,0	55,3 ± 5,2	31,9 ± 3,7	32,4 ± 2,7
3,13	60,9 ± 3,0	33,1 ± 2,6	26,3 ± 0,8	20,1 ± 4,4
1,56	43,8 ± 0,9	27,7 ± 3,1	23,6 ± 1,4	20,8 ± 2,0
0,78	25,5 ± 3,4	23,9 ± 2,7	21,7 ± 2,4	20,3 ± 3,9
0,39	19,9 ± 2,1	21,3 ± 3,9	21,7 ± 0,9	11,4 ± 5,7

Tab. Anhang 12: Wachstumshemmung von *Bacillus subtilis* durch bestrahltes TED.

Verdünnung [%]	Ted t_0	Ted $t_{1/4}$	Ted $t_{1/16}$	Ted $t_{1/64}$
50 (5 mg L ⁻¹)	89,3 ± 1,1	80,9 ± 0,5	77,7 ± 1,7	70,7 ± 2,5
25	86,4 ± 0,9	78,7 ± 0,3	71,8 ± 0,5	66,7 ± 2,4
12,5	86,7 ± 0,6	77,0 ± 0,8	69,1 ± 0,6	61,6 ± 0,9
6,25	83,6 ± 0,8	74,2 ± 0,9	65,2 ± 0,9	53,0 ± 3,8
3,13	81,2 ± 1,2	70,0 ± 5,2	48,3 ± 2,0	24,5 ± 3,3
1,56	74,2 ± 0,9	60,7 ± 1,1	28,0 ± 0,9	18,0 ± 7,0
0,78	69,0 ± 4,9	33,5 ± 1,3	22,8 ± 2,0	18,4 ± 4,2
0,39	43,2 ± 9,5	19,5 ± 0,4	19,0 ± 2,2	15,2 ± 4,6

Tab. Anhang 13: Leuchthemmung von *Aliivibrio fischeri* durch bestrahlte β -Lactam-Antibiotika [%].

Probe	Toxizität	Probe	Toxizität	Probe	Toxizität	Probe	Toxizität
AMX t ₀	13	AMP t ₀	12	PEN t ₀	12	PIP t ₀	12
AMX t _{1/4}	12	AMP t _{1/4}	11	PEN t _{1/4}	32	PIP t _{1/4}	17
AMX t _{1/16}	14	AMP t _{1/16}	11	PEN t _{1/16}	34	PIP t _{1/16}	18
AMX t _{1/64}	9	AMP t _{1/64}	21	PEN t _{1/64}	26	PIP t _{1/64}	15
		AMP _{TP3}	13	PEN _{TP1}	11	PIP _{TP4}	13

Tab. Anhang 14: Leuchthemmung von *Aliivibrio fischeri* durch bestrahlte Oxazolidinon-Antibiotika [%].

Probe	Toxizität [%]	Probe	Toxizität [%]
Lin t ₀	49	Ted t ₀	46
Lin t _{1/4}	40	Ted t _{1/4}	55
Lin t _{1/16}	34	Ted t _{1/16}	54
Lin t _{1/64}	36	Ted t _{1/64}	54
1% ACN in H ₂ O	<10		